

**Molekulare und funktionelle Untersuchungen zur
Rolle von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in der
Pathogenese maligner Gliome**

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**vorgelegt von
Anneliese Cosima Freia Forchmann
aus Jena**

Düsseldorf, Mai 2016

aus dem Institut für Neuropathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Guido Reifenberger
Korreferent: Prof. Dr. Christina R. Rose

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2016

Meine Dissertationsarbeit

widme ich

meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Gliome	1
1.1.1	Inzidenz, Epidemiologie, klinisches Verhalten und WHO-Klassifikation	1
1.1.2	Molekulare Charakterisierung	3
1.1.3	Diagnostische, prognostische und prädiktive Marker	5
1.2	MikroRNAs (MiRNAs)	6
1.2.1	Allgemeines und Funktion	6
1.2.2	MiRNAs in Tumoren	9
1.2.3	MiRNAs in Gliomen	10
1.2.4	Regulation der miRNA-Expression	11
1.2.5	Die miRNAs <i>miR-16-5p</i> und <i>miR-15a-5p</i>	12
1.3	Ziele der Arbeit	13
1.4	Vorarbeiten aus der eigenen Masterarbeit	14
1.4.1	Verminderte Expression von <i>miR-16-5p</i> in Gliomen	14
1.4.2	Verminderte Viabilität und Proliferation von Gliomzellen nach Überexpression von <i>miR-16-5p</i> oder <i>miR-15a-5p in vitro</i>	16
2	Materialien	18
2.1	Laborgeräte	18
2.2	Software	19
2.3	Reagenzien und Chemikalien	19
2.4	Antikörper	25
2.5	Plasmide	25
2.6	Bakterien	26

Inhaltsverzeichnis	II
2.7 Zellen	26
2.8 Menschliches Hirntumorgewebe	26
2.9 Lösungen	27
2.10 Oligonukleotide	29
2.11 Sequenzierung	31
3 Methoden	32
3.1 Molekularbiologische Methoden	32
3.1.1 Nukleinsäureextraktion aus Zellen	32
3.1.2 Reverse Transkription	32
3.1.3 Quantitative Realtime-PCR	33
3.2 Zellkulturbasierende Methoden	36
3.2.1 Kultivierung von Gliomzellen <i>in vitro</i>	36
3.2.2 Transiente Transfektion von Gliomzellen mit miRNA-Vorläufermolekülen	37
3.2.3 siRNA-medierter Knock-down von MYC und HDAC3	38
3.2.4 Behandlung von Gliomzellen mit 5-AZA-2'-Deoxycytidin oder Trichostatin A	39
3.2.5 Apoptoseassay	39
3.3 Proteinbiochemische Analysen	40
3.3.1 Proteinextraktion aus Zellen	40
3.3.2 Westernblot-Analysen	40
3.4 Luciferase Reportergen-Assay	42
3.4.1 Herstellung kompetenter Zellen	42
3.4.2 Klonierung der 3'-UTR-Konstrukte	43
3.4.3 Dual-Glo® Luciferase Assay System	44
3.5 Statistik	45

Inhaltsverzeichnis	III
4 Ergebnisse	46
4.1 Reduzierte Expression von <i>miR-16-5p</i> und <i>miR-15a-5p</i> in <i>IDH1/2</i> -mutierten astrozytären Gliomen	46
4.2 Verminderte Expression von <i>miR-16-5p</i> und <i>miR-15a-5p</i> in Gliomzelllinien	47
4.3 Überexpression von <i>miR-16-5p</i> und <i>miR-15a-5p</i> in Gliomzellen nach Transfektion der entsprechenden Vorläufer-miRNAs	47
4.4 Apoptoseinduktion nach Überexpression von <i>miR-16-5p</i> und <i>miR-15a-5p</i> in Gliomzellen	49
4.5 Identifizierung von <i>miR-16-5p</i> und <i>miR-15a-5p</i> Bindungsstellen in Zellzyklus- und Apoptose-regulierenden Genen	50
4.5.1 Verminderte mRNA-Expression von Zielgenen nach Überexpression von <i>miR-16-5p</i> und <i>miR-15a-5p</i> in Gliomzellen	51
4.5.2 Verminderte Protein-Expression von Zielgenen nach Überexpression von <i>miR-16-5p</i> und <i>miR-15a-5p</i> in Gliomzellen	54
4.5.3 Direkte Bindung von <i>miR-16-5p</i> und <i>miR-15a-5p</i> in der 3'-UTR von <i>WEE1</i> , <i>CHEK1</i> und <i>MCL1</i>	58
4.5.4 Erhöhte mRNA-Expression von <i>miR-16-5p</i> und <i>miR-15a-5p</i> Targetgenen in astrozytären Gliomen	62
4.6 Regulation der Expression von <i>miR-16-5p</i> und <i>miR-15a-5p</i> in Gliomen	64
4.6.1 DNA-Demethylierung zeigt keinen Einfluss auf die <i>miR-16-5p</i> und <i>miR-15a-5p</i> Expression in Gliomzellen	64
4.6.2 Überexpression von <i>miR-16-5p</i> und <i>miR-15a-5p</i> nach Histondeazetylase-Hemmung in Gliomzellen	66
4.6.3 Die Expression von <i>miR-16-5p</i> und <i>miR-15a-5p</i> wird durch den Knock-down von MYC induziert	69
4.6.4 Die Expression von <i>miR-16-5p</i> und <i>miR-15a-5p</i> wird durch den Knock-down von HDAC3 induziert	71

Inhaltsverzeichnis	IV	
5	Diskussion	73
5.1	Herrunterregulation von <i>miR-16-5p</i> und <i>miR-15a-5p</i> in astrozytären Gliomen	73
5.2	Pro-apoptotische Wirkung von <i>miR-16-5p</i> und <i>miR-15a-5p</i> in Gliomzellen	75
5.3	Direkte Regulation von zellzyklus- und apoptosesteuernden Targetgenen durch <i>miR-16-5p</i> und <i>miR-15a-5p</i>	76
5.4	Überexpression von zellzyklus- und apoptosesteuernden Targetgenen auf mRNA Ebene in astrozytären Gliomen	77
5.5	Regulation der <i>miR-16-5p</i> und <i>miR-15a-5p</i> Expression in Gliomen	78
6	Zusammenfassung	80
7	Abstract	82
8	Literaturverzeichnis	84
9	Danksagung	99
10	Ehrenwörtliche Erklärung	100

Abkürzungsverzeichnis

AII	Diffuses Astrozytom WHO-Grad II
AAIII	Anaplastisches Astrozytom WHO-Grad III
APS	Ammoniumpersulfat
Argo2	Argonaut 2
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATRX	<i>Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked</i>
BCL2	<i>B cell chronic lymphatic leukemia / lymphoma 2</i>
bp	<i>Base pair</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BMI-1	<i>Polycomb ring finger oncogene-1</i>
°C	Grad Celsius
CCN	<i>Cyclin</i>
CDC	<i>Cell division cycle</i>
cDNA	<i>Complementary desoxyribonucleic acid</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CDKN	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
CHEK1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
Chip	Chromatin-Immunpräzipitation
CIMP	<i>CpG-island hypermethylator phenotype</i>
CLL	<i>Chronic lymphocytic leukemia</i>
CpG	<i>Cytosine-phosphate-guanine</i>
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome chromosomal region 8</i>
DLEU	<i>Deleted in leukemia</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DNMT	<i>DNA-Methyltransferase</i>
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>

DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
Exp5	Exportin 5
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FC	<i>Fold change</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
GBIV	Glioblastom WHO-Grad IV
gDNA	genomische DNA
HDAC	<i>Histondeacetylase</i>
H ₂ O	Wasser
IDH	Isocitrat Dehydrogenase
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobase
kDa	Kilo-Dalton
L	Liter
M	Molar
mA	Milliamper
MCL1	<i>Myeloid Cell Leukemia 1</i>
MDM	<i>Murine double minute</i>
MGMT	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
min	Minute
miRNA	MicroRNA
ml	Milliliter
MPM	<i>Malignant pleural mesothelioma</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MSI1	Msi homolog 1
MW	Mittelwert
NB	<i>Normal brain (nicht-neoplastisches Hirngewebe)</i>
NC	<i>Negative control</i>
NDRG2	<i>NMYC downstream-regulated gene 2</i>

NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i>
OD	<i>Optical density</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGFRA	<i>Platelet-derived growth factor receptor alpha</i>
Pen	Penicillin
pGBIV	Primäres Glioblastom WHO-Grad IV
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
Ran-GTP	<i>Ras-related nuclear factor – Guanosin triphosphate</i>
RB1	<i>Retinoblastoma 1</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	Rotation pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse transkription-polymerase chain reaction</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl phosphate</i>
sek	Sekunden
sGBIV	Sekundäres Glioblastom WHO-Grad IV
siRNA	<i>Small-interfering ribonucleic acid</i>
Std	Stunde
Strep	Streptomycin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Bor-EDTA
TBST	Tris-Bor-Puffersalzlösung mit Tween 20
TE	Tris-EDTA
TEMED	N-N-N-N-Tetraethylmethyldiamin
TERT	Telomerase-reverse-Transkriptase
TMZ	Temozolomid
TP53	Tumor Protein p53

TRBP	<i>Transactivation-responsive RNA-binding protein</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSA	Trichostatin A
V	Volt
v/v	Volumen in Volumen
W	Watt
WEE1	<i>WEE1 G2 checkpoint kinase</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
Wip1	<i>Wild-type p53-induced phosphatase 1</i>
WNT3A	<i>Wingless-type MMTV integration site family member 3A</i>
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht in Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem
AZA	5-AZA-2'-Deoxycytidin
µl	Mikroliter

1 Einleitung

1.1 Gliome

1.1.1 Inzidenz, Epidemiologie, klinisches Verhalten und WHO-Klassifikation

Die jährliche Inzidenz von primären intrakraniellen Tumoren beträgt circa 16,5 Patienten pro 100.000 Einwohner (Ostrom et al. 2015). Unter den intrakraniellen Tumoren sind die Gliome mit circa 36 % der Fälle die häufigsten primären Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS). Sie treten zumeist im Gehirn auf, sind aber auch im Rückenmark zu finden. Vermutlich entstehen sie aus neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen. Meningiome bilden die zweithäufigste Tumorgruppe mit einer Häufigkeit von 32 % der primären Tumoren im ZNS. Weitere Hirntumorformen wie das Schwannom, das Hypophysenadenom oder das primäre Lymphom des ZNS treten im Vergleich zu den Gliomen und Meningiomen weniger häufig auf (Ostrom et al. 2015).

Gliome unterscheidet man anhand der Ähnlichkeit der Tumorzellen zu den verschiedenen Gliazellen in Astrozytome, Oligodendrogliome, Oligoastrozytome und Ependymome (Louis et al. 2007). Die unterschiedlichen Gliome werden gemäß der Weltgesundheitsorganisation (WHO, engl.: *World Health Organization*) anhand von histologischen Kriterien in vier Grade (WHO-Grad I bis IV) eingestuft (Louis et al. 2007). Niedriggradige Gliome (WHO-Grad I und II) sind gut differenziert und langsam wachsende Tumoren. Im Gegensatz dazu sind hochgradige Gliome (WHO-Grad III und IV) undifferenziert, schnell wachsend und mit einer schlechteren Überlebensprognose als WHO-Grad I und II Tumoren assoziiert (Weller et al. 2015).

Die astrozytären Gliome können anhand ihres Wachstumsmusters in zwei Gruppen unterteilt werden. Das heißt, die Tumoren mit umschriebenem Wachstum wie die pilozytischen Astrozytome bilden die eine und diejenigen Tumoren mit diffus infiltrativem Wachstum wie die diffusen und anaplastischen Astrozytome sowie die Glioblastome bilden die zweite Gruppe. Das pilozytische Astrozytom (WHO-Grad I) ist ein langsam und umschrieben wachsender Tumor mit einer günstigen Prognose, der zumeist im Kindesalter auftritt. Prädilektionsstellen sind der vordere Bereich der

Sehbahn, der Hypothalamus und das Kleinhirn. In der Gruppe der diffus infiltrierend wachsenden astrozytären Gliome unterscheidet man diffuse Astrozytome (WHO-Grad II), anaplastische Astrozytome (WHO-Grad III) und Glioblastome (WHO-Grad IV). Diffuse Astrozytome sind hauptsächlich in der weißen Substanz lokalisiert und wachsen infiltrativ ins Hirnparenchym mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr. Eine vollständige Resektion ist durch das infiltrative Wachstum meist nicht möglich. Deshalb entstehen sehr oft Rezidive, die nicht selten eine maligne Progression zu einem anaplastischen Astrozytom oder einem sekundären Glioblastom vollziehen. Anaplastische Astrozytome zeigen feingewebliche Merkmale der Anaplasie, insbesondere eine erhöhte Mitoserate, die für ein rasches und malignes Tumorwachstum sprechen. Der Altersgipfel liegt zwischen dem 35. und 45. Lebensjahr. Sekundäre Glioblastome entstehen aus diffusen oder anaplastischen Astrozytomen, während primäre Glioblastome *de novo*, das heißt mit kurzer Vorgeschichte und ohne einen vorbestehenden niedriggradigeren Vorläufertumor auftreten (Louis et al. 2007; Ohgaki und Kleihues 2007). Primäre Glioblastome machen circa 90 % aller Glioblastome aus und treten bevorzugt im Großhirn von älteren Erwachsenen zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr auf (Louis et al. 2007; Ohgaki und Kleihues 2007).

Primäre Glioblastome sind die häufigsten und bösartigsten Hirntumoren. Im Median beträgt die Überlebenszeit von Patienten mit primären Glioblastomen trotz multimodaler Therapie mit Resektion, Chemo- und Radiotherapie nur circa 12-14 Monate nach Diagnosestellung (Stupp et al. 2009).

Das Gesamtüberleben von Gliompatienten ist abhängig von zahlreichen Faktoren, wie dem Patientenalter, dem klinischen Status, dem Ausmaß der Tumorsektion, der Histologie des Tumors, dem WHO-Grad und bestimmten molekulargenetischen Veränderungen im Tumorgewebe (Weller et al. 2015). Wie Tumoren im Allgemeinen sind auch Gliome das Ergebnis von genetischen Alterationen, die in den Tumorzellen akkumulieren und zur Tumorprogression führen. Das Wissen um die genetischen Veränderungen in Gliomen hat in den letzten Jahren stark zugenommen (Riemenschneider et al. 2010; Weller et al. 2015).

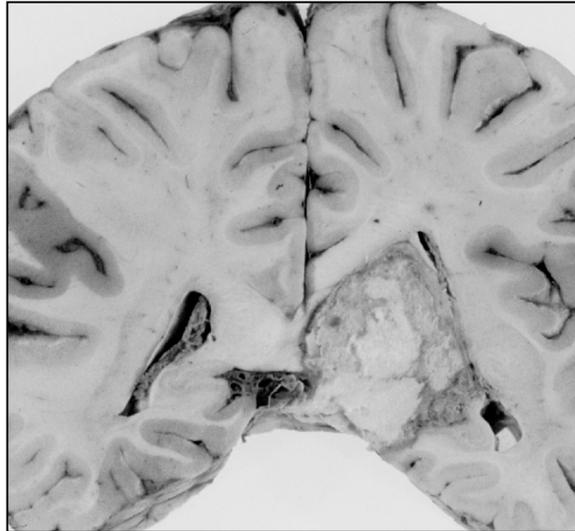


Abbildung 1: Gezeigt ist ein Autopsiepräparat mit einem Frontalschnitt durch das Großhirn mit einem primären Glioblastom (WHO-Grad IV) in der rechten Hemisphäre. Die rechte Hirnhälfte zeigt die makroskopischen Veränderungen wie eine zentrale Nekrose und vitales Tumorgewebe in der Tumorperipherie. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Herrn Priv.-Doz. Dr. Jörg Felsberg, Institut für Neuropathologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

1.1.2 Molekulare Charakterisierung

In diffusen Astrozytomen ist in circa 70 % der Fälle eine Mutation im *Isocitrat Dehydrogenase 1 (IDH1)* Gen zu finden (Balss et al. 2008; Sabha et al. 2014). Zusätzlich treten Gewinne des langen Arms von Chromosom 7 und Trisomien des Chromosoms 7 mit einer Häufigkeit von circa 50 % auf (Perry et al. 1997). Des Weiteren ist das Tumorsuppressorgen *tumor protein p53 (TP53)* auf 17p13.1 in über 60 % der Fälle mutiert (Louis et al. 2007). Darüber hinaus zeigen diffuse Astrozytome ohne Mutation im *TP53* Gen eine $p14^{\text{ARF}}$ Promoterhypermethylierung auf 9p21, welches die *murine double minute 2 (MDM2)*-mediierende *p53* Degradation kontrolliert (Watanabe et al. 2007). Weiterhin ist beschrieben, dass der *platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA)* häufig in diffusen Astrozytomen überexprimiert ist (Hermanson et al. 1992). Weitere häufige Alteration sind Allelverluste der Chromosomenarme Xp, 1p, 10p, 13q, 19q und 22q als auch Zugewinne von 5p, 9q und 19p. Außerdem werden auch Genamplifikationen auf 8q und Verluste von Chromosom 6 beschrieben (Reifenberger und Collins 2004; Louis et al. 2007). Aktuelle Arbeiten, die auf Hochdurchsatzsequenzierungen mittels *next generation sequencing (NGS)* basieren, zeigten in nahezu allen *IDH1* oder *IDH2* mutierten diffusen Astrozytomen

zusätzlich *TP53* Mutationen und Mutationen im *alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (ATRX)* Gen (Brat et al. 2015; Suzuki et al. 2015).

Anaplastische Astrozytome haben ähnliche genetische Alterationen wie diffuse Astrozytome. Typisch sind Mutationen in den Genen *IDH1* oder *IDH2*, *TP53* und *ATRX*. Der Chromosomenarm 17p ist von Deletionen und Chromosom 7 von Gewinnen betroffen. Weiterhin werden Chromosomenarmdeletionen von 6q, 9p, 10q, 11p, 19q und 22q beschrieben. Hingegen sind Mutationen im *phosphatase and tensin homolog (PTEN)* Tumorsuppressorgen selten (Louis et al. 2007; Riemenschneider und Reifenberger 2009; Riemenschneider et al. 2010).

Glioblastome zeigen in der Gruppe der Gliome die facettenreichsten genetischen, epigenetischen und chromosomalen Anomalien, die verschiedene Tumorsuppressor- und Onkogene betreffen. Beide Glioblastomformen – sekundäre und primäre Glioblastome - haben verschiedene genetische Aberrationen (Ohgaki und Kleihues 2007). Monosomie 10 und Trisomie 7 sind in primären Glioblastomen sehr häufig (Bigner und Vogelstein 1990). Des Weiteren werden Amplifikationen der Gene *epidermal growth factor receptor (EGFR)*, *cyclin-dependent kinase 4 (CDK4)*, *MDM2* und *MDM4* sowie Mutation in den Genen *PTEN* und *TP53* gefunden (Riemenschneider und Reifenberger 2010; Weller et al. 2015). Weiterhin lassen sich homozygote Deletionen der Gene *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)*, *cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (CDKN2B)*, *p14^{ARF}* und *retinoblastoma 1 (RB1)* nachweisen (Riemenschneider und Reifenberger 2010; Weller et al. 2015). Zusätzlich sind Promoterhypermethylierungen des *NMYC downstream-regulated gene 2 (NDRG2)* beschrieben (Louis et al. 2007; Tepel et al. 2008; Riemenschneider und Reifenberger 2009; Riemenschneider et al. 2010). Primäre Glioblastome weisen typischerweise keine *IDH1* oder *IDH2* Mutationen auf (Weller et al. 2015). In mehr als 80 % der primären Glioblastome finden sich aber aktivierende Mutationen im *telomerase reverse transcriptase (TERT)* Gen-Promotor (Killela et al. 2013; Killela et al. 2014). Sekundäre Glioblastome zeigen dagegen in über 60 % der Fälle Mutationen in den Genen *IDH1* beziehungsweise *IDH2*, typischerweise kombiniert mit *TP53* und *ATRX* Mutationen (Weller et al. 2015). Weiterhin kommen gehäuft Allelverluste auf den Chromosomenarmen 10q, 13q und 19q und eine Überexpression von *PDGFRA* vor (Ohgaki und Kleihues 2007). *PTEN*- und *TERT*-Promotor-Mutationen sowie

Genamplifikationen sind dagegen selten in sekundären Glioblastomen. Glioblastome und andere Gliome mit *IDH1* oder *IDH2* Mutationen zeigen oft eine Promoterhypermethylierung multipler Gene, ein Phänomen, das als *CpG-island hypermethylator phenotype* (CIMP) bezeichnet wird (Noushmehr et al. 2010). Dies führt zur epigenetischen Inaktivierung zahlreicher Gene, darunter unter anderem auch das *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase* (*MGMT*) Gen, das in fast allen *IDH1/2* mutierten Gliomen aber nur in circa 40 % der *IDH1/2* nicht-mutierten Glioblastome durch eine Promotormethylierung transkriptionell inaktiviert ist (Wick et al. 2014).

1.1.3 Diagnostische, prognostische und prädiktive Marker

In den letzten Jahren wurden zahlreiche diagnostische, prognostische und prädiktive Marker für Gliome identifiziert. Ein wichtiger prognostischer und prädiktiver Marker ist in der Tat das oben genannte *MGMT* Gen auf dem langen Arm von Chromosom 10 (10q26), welches häufig durch Promotermethylierung in diffusen Gliomen stillgelegt ist, was zur verminderten *MGMT* Expression führt. Diese *MGMT* Methylierung ist in circa 40 % der primären Glioblastome zu finden und führt zu einem besseren Ansprechen von Gliompatienten auf Radio- und Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) und somit zu einem signifikant längerem Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten, deren Tumoren keine *MGMT* Methylierung aufweisen (Hegi et al. 2005). Vor allem für ältere Patienten wird der *MGMT*-Marker verwendet, um zwischen einer postoperativen Chemo- oder Radiotherapie zu entscheiden (Malmstrom et al. 2012; Reifenberger et al. 2012; Wick et al. 2012; Wick et al. 2014).

Ein weiterer diagnostischer und prognostischer Marker für das Überleben von Gliompatienten ist der *IDH1/2* Mutationsstatus. Patienten mit einem Glioblastom, das ein mutiertes *IDH1* oder *IDH2* Gen aufweist, zeigen ein besseres Gesamtüberleben als Glioblastompatienten, deren Tumoren diese Mutation nicht aufweisen (Parsons et al. 2008; Weller et al. 2009). *IDH1* Mutationen werden zumeist in diffusen und anaplastischen Astrozytomen, oligodendroglialen Tumoren und sekundären Glioblastomen gefunden (Weller et al. 2015). In einer kleinen Gruppe dieser Tumoren, die keine *IDH1* Mutation zeigten, konnten *IDH2* Mutationen gefunden werden (Yan et al. 2009), die in analoger Weise zu einer erhöhten Produktion von 2-Hydroxyglutarat

und konsekutiv zu einem CIMP Phänotyp führen (Figueroa et al. 2010; Ward et al. 2010; Xu et al. 2011; Al-Dimassi et al. 2014).

1.2 MikroRNAs (MiRNAs)

1.2.1 Allgemeines und Funktion

MikroRNAs (miRNAs) wurden 1993 entdeckt, das heißt es wurde herausgefunden, dass ein 22 Nukleotide langes RNA-Fragment, genannt *lin-4*, für die zeitliche Koordination der post-embryonalen Entwicklung von *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) notwendig ist (Lee et al. 1993; Wightman et al. 1993). Seit der Entdeckung der ersten miRNA wurden in Tieren und Pflanzen zahlreiche miRNAs gefunden (Bartel 2004; Orellana und Kasinski 2015; Brat et al. 2015; Singh 2016). Reife miRNAs sind natürlich vorkommende, kleine, nicht-kodierende RNA-Moleküle, die eine Länge von 21-25 Nukleotiden haben. MiRNAs sind partiell komplementär zu einer oder mehreren *messenger*-RNA(mRNA)-Molekülen und eine ihrer Hauptfunktionen liegt in der Herabregulation der Genexpression. Diese kann durch die Repression der Translation, die Spaltung der mRNA oder eine Deadenylierung durch die sequenzspezifische Bindung an die 3'-UTR der mRNA induziert werden (Ambros 2004). Daneben wurde aber auch beschrieben, dass die Bindung bestimmter miRNAs an die 3'-UTR einer mRNA zur Aktivierung der Translation beitragen kann (Vasudevan et al. 2007). Des Weiteren zeigen bioinformatische Studien, dass zahlreiche Bindestellen für miRNAs in den 5'-UTRs oder der kodierenden Region von Genen liegen können (Ørom et al. 2008; Zhou et al. 2009; Panda et al. 2014). Die Bindung einer miRNA in der 5'-UTR kann zu einer verstärkten Translation führen, wobei der Mechanismus noch unklar ist (Ørom et al. 2008; Panda et al. 2014).

MiRNAs haben wichtige Funktionen in zahlreichen biologischen Prozessen wie in der Zelldifferenzierung, Entwicklung, Regulation des Zellzykluses, der Apoptose, Seneszenz und im Stoffwechsel (Ambros 2004; Garzon et al. 2009). Eine Deregulation von miRNAs wurde in zahlreichen Tumorentitäten gefunden, so auch in Gliomen. MiRNAs können als Tumorsuppressoren fungieren, wenn ihre Inaktivierung die maligne Tumorbildung von Zellen durch die verstärkte Expression von Proteinen mit

onkogenem Potential fördert. Die Inaktivierung der miRNA kann dabei durch verschiedene Mechanismen wie Mutationen, genomische Deletionen, epigenetische Inaktivierung oder Alteration in der miRNA Prozessierung begründet sein (Garzon et al. 2009). Zu den ersten als tumorsuppressiv berichteten miRNAs gehören *miR-15* und *miR-16* (Calin et al. 2002).

MiRNA Gene findet man im gesamten Genom, ausgenommen dem Y-Chromosom. Die meisten miRNAs sind in verwandten Spezies evolutionär konserviert und zwischen entfernteren Spezies gibt es viele Homologien. Die miRNAs aller Spezies haben eine einheitliche und eindeutige Annotation. Der erste Teil des Namens beschreibt die Spezies, beispielsweise „*hsa*“ für *Homo sapiens*. Nur die ersten miRNA, die entdeckt wurden, haben ihren Namen von ihrem Phänotyp, wie *lin-4*, *let-7* oder *lcy-6*. Wenn dieselbe reife miRNA von verschiedenen miRNA-Genen kodiert wird, die in verschiedenen Regionen des Genoms lokalisiert sind, wird ein numerisches Suffix an den Namen angehängt (*hsa-miR-...-1* und *hsa-miR-...-2*). Jeder Locus produziert zwei reife miRNAs, eine vom 5' und eine vom 3' Strang der Vorläufer miRNA (*hsa-miR-...-5p* und *hsa-miR-...-3p*). Allerdings ist einer der Arme – *guide strand* – wesentlich verbreiteter mit 96 % – 99 % und biologisch aktiver als der andere Arm – *passenger strand* (komplementäre Strang). Außerdem gibt es paraloge miRNAs, die nahezu die gleiche Sequenz oder die gleiche Seed-Sequenz haben (*hsa-miR-...a* und *hsa-miR-...b*), sie bilden eine miRNA Familie (Landgraf et al. 2007), da sie zumeist die selbe Funktion und gleiche Targetgene haben (Ha und Kim 2014).

Ein charakteristisches Kennzeichen der genomischen Organisation von miRNAs ist, dass viele miRNAs in so genannten Clustern organisiert sind (Landgraf et al. 2007), die als polycistronisches primäres Transkript zusammen abgelesen werden (Lee 2002). MiRNAs in Clustern sind oft verwand miteinander, was dafür spricht, dass die Cluster sich durch Genduplikation entwickelt haben. MiRNAs mit identischen Sequenzen im Nukleotid 2-8 einer reifen miRNA gehören zu einer gemeinsamen miRNA-Familie und haben oft die gleichen Targetgene und Funktionen in der Zelle (Landgraf et al. 2007).

Die Biogenese der miRNAs ist ein hoch spezifischer Prozess. MiRNAs werden durch die RNA Polymerase II zu langen RNA Vorläufermolekülen, die bis zu einige Kilobasenpaare lang sind, mit 5'CAP und poly-A Schwanz transkribiert (*primary-miRNA* (pri-miRNA) (Lee et al. 2004). Im Nukleus wird die pri-miRNA durch den

Mikroprozessor-Komplex, der aus dem RNase III Enzym Drosha (Han 2004) und dem doppelstrangbindenden RNA-Bindeprotein Pasha / *DiGeorge Syndrome chromosomal region 8 Microprocessor Complex Subunit* (DGCR8) besteht, zu einem ~ 70 Nukleotide langen Vorläufermolekül (pre-miRNA) prozessiert, das zu einer unvollendeten *stem-loop* Struktur gefaltet ist (Denli et al. 2004). Die pre-miRNA wird anschließend mittels *karyopherin exportin 5* (Exp5) und dem *ras-related nuclear factor – Guanosintriphosphate* (Ran-GTP) Komplex aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert (Yi et al. 2003).

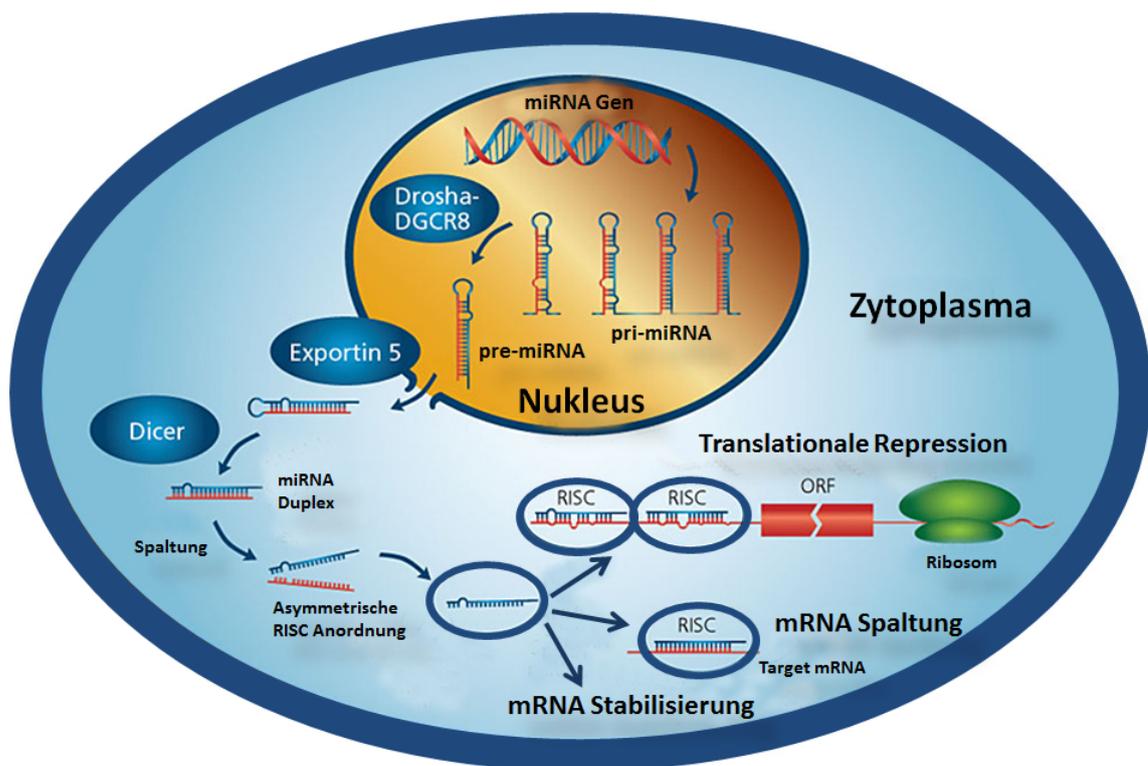


Abbildung 2: MiRNA-Biogenese. MiRNAs werden im Nucleus von der RNA-Polymerase II zu einem primären Transkript (pri-miRNA) abgelesen, welches dann von Drosha und der *DiGeorge Syndrome chromosomal region 8 Microprocessor Complex Subunit* (DGCR8) zur pre-miRNA gespalten wird. Die pre-miRNA wird mittels Exportin 5 durch Kernporen ins Zytoplasma transportiert. Dann wird die pre-miRNA durch das RNase III Enzym Dicer zur reifen miRNA gespalten, welche in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) Komplex eingebaut wird und dann die Translation hemmt beziehungsweise die mRNA spaltet oder stabilisiert. Modifiziert nach (Winter et al. 2009; Garzon et al. 2009).

Im Zytoplasma wird die pre-miRNA weiter zur miRNA, die doppelsträngig ist und eine Länge von circa 22 Nukleotiden hat, prozessiert (Bernstein et al. 2001). Dicer initiiert die Formation des *RNA-induced silencing complex* (RISC) (Hammond 2005), welcher aus den Proteinen *Argonaute 2* (Argo 2) und dem *transactivation-responsive RNA-*

binding protein (TRBP) besteht (Schwarz et al. 2003; Garzon et al. 2009). Der reife Strang bleibt im RISC-Komplex und der komplementäre Strang wird degradiert. Der reife Strang detektiert komplementäre Sequenzen von Ziel-mRNAs und leitet so den miRNA-RISC Komplex zu der komplementären mRNA, um die Genexpression durch Inhibierung oder Stabilisierung der entsprechenden mRNA zu verändern (Diederichs und Haber 2007; Ørom et al. 2008; Zhou et al. 2009; Panda et al. 2014) (Abbildung 2). MiRNAs reprimieren ihre respektiven mRNA-Targetgene nach zwei verschiedenen Prinzipien abhängig von dem Grad der Komplementarität mit ihrem Targetgen. Zum einen können miRNAs perfekt komplementär mit der Targetgen-mRNA sein. Dadurch wird die Endonukleaseaktivität von Ago2 aktiviert (Meister et al. 2004). In den meisten Fällen jedoch bindet die miRNA nicht perfekt an die Targetgen-mRNA. In diesem Fall wird die Targetgenerkennung durch die perfekte Basenpaarbindung zwischen der „Seed“-Sequenz, die an der Stelle 2-7 der miRNA Sequenz lokalisiert ist, und der Targetgen-mRNA garantiert (Brennecke et al. 2005). Diese nicht perfekte Bindung des miRNA:mRNA Duplexes führt zur post-transkriptionalen Repression durch die Blockierung der Initiation oder die Hemmung der Post-Initiation.

1.2.2 MiRNAs in Tumoren

Es ist bekannt, dass die Karzinogenese durch die Deregulation der normalerweise fein abgestimmten Genexpression gekennzeichnet ist (Ramaswamy et al. 2001; Su et al. 2001). Im Zusammenhang mit ihrer Rolle in der Genregulation wurde für miRNAs gezeigt, dass diese sowohl als potentielle Onkogene als auch als Tumorsuppressorgene fungieren können (Garzon et al. 2009). In vielen Arbeiten wurde gezeigt, dass in Tumorzellen eine Deregulation der miRNA-Expression zu finden ist. Diese Expressionsveränderungen können, ebenso wie die veränderte mRNA-Expression, die Prognose von Tumoren beeinflussen und als molekulare Biomarker für eine verbesserte Tumorklassifikation eingesetzt werden (Calin und Croce 2006).

MiRNA-Expressionsprofile sind für den jeweiligen Zelltyp und den Differenzierungsstatus der Zelle sehr spezifisch (Aravin et al. 2003; Bernstein et al. 2003; Abbott et al. 2005). Zellen, die eine maligne Transformation durchlaufen, unterscheiden sich im Phänotyp und Differenzierungsstatus von dem umgebenden gesunden Gewebe. Tumorzellen haben viele Eigenschaften einer normalen Zelle

verloren. Sie umgehen die Apoptose, haben keine Kontaktinhibition mehr, sind resistent für wachstumshemmende Signale oder fördern das Tumorwachstum mittels Neoangiogenese (Hanahan und Weinberg 2011). Eine Deregulation des miRNA-Expressionsprofils kann der Grund oder die Konsequenz für diese Ereignisse sein.

Die ersten beiden miRNAs, die in einem kausalen Zusammenhang mit der Tumorphathogenese bei der Chronischen Lymphatischen Leukämie (CLL) gestellt wurden, waren *miR-15a-5p* und *miR-16-5p*. Es wurde beschrieben, dass beide miRNAs, die tumorsuppressiv wirken, die Expression von *B cell CLL/lymphoma 2* (BCL2) in CLL-Zellen direkt regulieren (Cimmino et al. 2005). Die genomischen Regionen der miRNAs *miR-15a-5p* und *miR-16-5p* sind häufig bei Patienten mit CLL, Mantelzelllymphomen oder multiplen Myelomen (Calin et al. 2002; Calin et al. 2005) sowie in Postatakarzinomen (Dong et al. 2001) deletiert. Die verminderte Expression von *miR-15a-5p* oder *miR-16-5p* führt zu einer erhöhten Expression von onkogenen Proteinen wie beispielsweise BCL2.

1.2.3 MiRNAs in Gliomen

In der Entwicklung des Gehirns können spezifische miRNA-Muster zu bestimmten entwicklungsbiologischen Zeitpunkten gefunden werden (Miska et al. 2004). Des Weiteren wurden verschiedenen miRNAs wichtige Rollen in der neuronalen Differenzierung und Entwicklung zugesprochen (Follert et al. 2014; Iyengar et al. 2014; Davis et al. 2015; Gardiner et al. 2015; Woldemichael und Mansuy 2016). Die erste Veröffentlichung, die eine veränderte miRNA-Expression in Glioblastomen beschrieb, zeigte eine starke Überexpression der miRNA *miR-21*, welche mit einer Hemmung der Apoptose in den Gliomzellen einherging (Chan et al. 2005). In weiteren Expressionsstudien konnten zahlreiche miRNAs identifiziert werden, die in Gliomen verstärkt beziehungsweise vermindert im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe exprimiert werden (Chan et al. 2005; Ciafrè et al. 2005; Godlewski et al. 2008; Silber et al. 2008; Rao et al. 2010; Brower et al. 2014).

Neben der Analyse von miRNA-Expressionsprofilen hat in den letzten Jahren die Identifikation der Funktionen von miRNAs stark zugenommen. In Gliomen haben miRNAs wichtige Aufgaben für die Regulation von Proliferation, Apoptose, Zellmigration, Zytoskelettarrangements und Angiogenese (Riemenschneider und

Reifenberger 2009; Hermansen und Kristensen 2013; Aldape et al. 2015). So wurden zahlreiche direkte Targetgene der miRNAs identifiziert und deren Regulationsweisen besser verstanden. Beispielsweise wurde *miR-128* als eine miRNA beschrieben, die das Tumorwachstum durch die Regulierung von zahlreichen Targetgenen wie *polycomb ring finger oncogene (BMI-1)* (Godlewski et al. 2008), *EGFR* und *PDGFR* beeinflusst (Papagiannakopoulos et al. 2012). Weitere direkte Targetgene von *miR-128* wie *WEE1 G2 checkpoint kinase 1 (WEE1)* und *Msi homolog 1 (MSI1)* (Wuchty et al. 2011) sind in der Proliferation von Gliomzellen involviert und p70S6K1 (Shi et al. 2012) spielt in der Angiogenese eine wichtige Rolle. Somit stellt *miR-128* ein potentiell interessantes Target für einen gezielten Therapieansatz von Gliomen dar.

1.2.4 Regulation der miRNA-Expression

Die miRNA-Expression ist auf vielen Ebenen der Genregulation feinjustiert beziehungsweise bei verschiedenen Krankheiten dereguliert. Die miRNA-Transkription kann positiv oder negativ als Konsequenz von genetischen oder epigenetischen Alterationen oder durch die Bindung von transkriptionalen Aktivatoren oder Inhibitoren in der Promotorregion beispielsweise des entsprechenden Wirtsgens der miRNA dereguliert sein (Calin et al. 2004; O'Donnell et al. 2005; Garzon et al. 2009). Zusätzlich ist die miRNA-Biogenese auf vielen Ebenen, wie der Transkription, der Prozessierung durch Drosha und Dicer im Nukleus und im Zytoplasma reguliert. Weiterhin spielen Modifizierungen durch RNA-Editing, RNA-Methylierung, Uridylylierung und Adenylierung eine wichtige Rolle. Auch nicht-kanonische Wege der RNA-Biogenese, die unabhängig von Drosha und Dicer sind, wurden beschrieben (Ha und Kim 2014). Ebenso können Deletionen oder Amplifikationen bestimmter Chromosomenabschnitte zu einer erniedrigten beziehungsweise erhöhten miRNA-Expression führen.

Die miRNA-Expression kann auch epigenetisch reguliert werden. Hierbei spielen die Veränderungen der DNA-Methylierung und Histonmodifikationen für die aberrante Expression der miRNAs eine wichtige Rolle. Es wird angenommen, dass circa fünf bis zehn Prozent der Säugetier-miRNAs epigenetisch reguliert werden (Saito et al. 2006; Toyota et al. 2008). Die Transkriptionsrate der miRNAs *miR-148a*, *miR-34b*, *miR-34c*, *miR-9* und *let7a-3* ist beispielsweise abhängig vom DNA-Methylierungsstatus und der Expressionsstärke der *DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1)* und der *DNA-*

Methyltransferase 3b (DNMT3b) (Saito et al. 2006; Han et al. 2007; Toyota et al. 2008; Lujambio und Lowe 2012). In Blasenkarzinomen wurde beschrieben, dass die Expression von *miR-127* nach Inhibierung der DNA-Methyltransferasen mittels 5-AZA-2'-Deoxycytidin (AZA) und Zugabe des Histondeazetylase(HDAC)-Inhibitors 4-Phenyl-Buttersäure ungefähr 50-fach hochreguliert ist (Saito et al. 2006). Chip-Assays zeigten einen Anstieg der H3 Acetylierungen und H3-K4 Methylierungen nach Behandlung, was zu der erhöhten *miR-127* Expression führt (Saito et al. 2006). Des Weiteren wurde beobachtet, dass nach HDAC-Inhibition mittels Trichostatin A (TSA) im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom die Expression von *DLEU2*, *miR-15a-5p* und *miR-16-5p* erhöht ist (Chen et al. 2013). In der CLL wurde nachgewiesen, dass bestimmte HDACs (HDAC1-3) überexprimiert werden und dadurch *miR-15a-5p*, *miR-16-5p* und *miR-29b* epigenetisch stillgelegt sind. HDAC-Inhibition führte zur Akkumulation der transkriptionell aktiven Chromatinmodifikation H3K4me2 und stellte dadurch die Expression von *miR-15a-5p*, *miR-16-5p* und *miR-29b* wieder her (Sampath et al. 2012).

1.2.5 Die miRNAs *miR-16-5p* und *miR-15a-5p*

In Säugetieren ist *miR-16* in zwei Clustern mit *miR-15* kolokalisiert. *MiR-15a* und *miR-16-1* liegen in dem nicht-kodierenden Gen *deleted in leukemia 2 (DLEU2)* in der chromosomalen Region 13q14.2, während *miR-15b* und *miR-16-2* in der chromosomalen Region 3q26.1 in dem Gen *structure maintenance of chromosome 4 (SMC4)* lokalisiert sind (Finnerty et al. 2010; Lages et al. 2011). *MiR-15* und *miR-16* gehören zu der *miR-15/miR-107*-Familie, die durch die gleiche Sequenz am 5'-Ende der miRNA charakterisiert ist und insgesamt zehn miRNAs (*miR-107*, - *103*, -*15a*, -*15b*, -*16*, -*195*, -*497*, -*503*, -*424*, -*646*) umfasst (Griffiths-Jones 2004; Finnerty et al. 2010).

Eine Deregulation der Expression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* steht oft im Zusammenhang mit einer Deletion der 13q14.3-Region, was man in unterschiedlichen Tumoridentitäten wie CLL und verschiedenen soliden Tumoren fand (Bottoni et al. 2005; Calin und Croce 2006; Bonci et al. 2008), darunter Prostatumoren (Bonci et al. 2008; Takeshita et al. 2010), Hypophysenadenome (Bottoni et al. 2005), Lungentumoren (Bandi und Vassella 2011), kolorektale Tumoren (Qian et al. 2013),

maligne Mesotheliome der Pleura (*malignant pleural mesothelioma* = MPM) (Reid et al. 2013) und Blasen Tumoren (Jiang et al. 2013).

Die bisher identifizierten Zielgene der *miR-16-5p* wie *B-cell lymphoma 2 (BCL2)* (Cimmino et al. 2005; Bonci et al. 2008), *Cyclin dependent kinase 6 (CDK6)* (Liu et al. 2008), *wingless-type MMTV integration site family member 3A (WNT3A)*, *Cyclin D1 (CCND1)* (Bonci et al. 2008), *Cyclin D3 (CCND3)* (Liu et al. 2008), *Cyclin E1 (CCNE1)* (Liu et al. 2008; Bandi et al. 2009; Wang et al. 2009), *Cell division cycle 25A (CDC25A)* (Pothof et al. 2009), *WEE1 G2 checkpoint kinase (WEE1)* (Lezina et al. 2013), *Checkpoint kinase 1 (CHEK1)* (Lezina et al. 2013) und *wild-type p53-induced phosphatase 1 (WIP1)* (Zhang et al. 2010) legen den Schluss nahe, dass *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus, der Proliferation und der Apoptose spielen (Cimmino et al. 2005; Bonci et al. 2008; Aqeilan et al. 2010; Ofir et al. 2011).

1.3 Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der in Gliomen differenziell exprimierten Kandidaten-miRNAs *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* funktionell zu charakterisieren. In Vorarbeiten, welche zum Teil im Rahmen der eigenen Masterarbeit durchgeführt wurden (Forchmann 2011), wurde die Proliferation und Viabilität nach Überexpression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in Gliomzellen analysiert. In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde zusätzlich die Apoptoserate in Gliomzellen nach Überexpression von *miR-16-5p* beziehungsweise *miR-15a-5p* untersucht. Anschließend wurden mittels Zielgenvorhersageprogrammen potentielle direkte Zielgene für *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* identifiziert und deren Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in Gliomzellen nach Überexpression von *miR-16-5p* beziehungsweise *miR-15a-5p* bestimmt. Mittels des Luciferase-Reporter-Gen-Assays wurde die direkte Bindung der miRNA an ausgewählte Zielgen-mRNAs validiert. Des Weiteren sollte analysiert werden, warum *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in Gliomen im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe vermindert exprimiert werden. Hierzu wurden epigenetische Regulationsmechanismen und die Rolle von MYC und HDAC3 als potentielle Regulatoren von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* untersucht.

1.4 Vorarbeiten aus der eigenen Masterarbeit

1.4.1 Verminderte Expression von *miR-16-5p* in Gliomen

In der eigenen Masterarbeit (Forchmann 2011) wurden bereits erste Vorarbeiten für die vorliegende Dissertationsschrift durchgeführt, die im Folgenden nochmals kurz zusammengefasst werden. Aus zahlreichen differenziell exprimierten miRNAs, die bei der Analyse von Tumorgewebeproben aus Gliompatienten mit Hilfe einer auf der *TaqMan® Array microfluid cards*-Technologie beruhenden Expressionsanalyse gefunden wurden, wurde die *miR-16-5p* für weitere Analysen ausgewählt. *MiR-16-5p* war in diffusen Astrozytomen WHO-Grad II (AII), anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad III (AAIII), sekundären Glioblastomen WHO-Grad IV (sGBIV) und einem Teil der primären Glioblastome WHO-Grad IV (pGBIV) im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe herunterreguliert (Abbildung 3A). Die Expressionen waren in AII 4,6-fach, in AAIII 4-fach und sGBIV 3,2-fach im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe vermindert. In pGBIV wurde eine variable *miR-16-5p* Expression gefunden. Vierzig von Vierundfünfzig Patientenproben zeigten eine niedrigere und die übrigen vierzehn Patientenproben eine höhere *miR-16-5p*-Expressionen im Vergleich zu nicht-neoplastischen Hirngewebsproben (Abbildung 3A). Die beiden miRNAs *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* sind in einem Cluster auf dem Chromosom 13q14.2 lokalisiert und besitzen das gleiche Sequenzmotiv. Aus diesem Grund wurde auch die Expression von *miR-15a-5p* auf mRNA-Ebene in Gliomen analysiert. Die Expressionsanalyse von *miR-15a-5p* zeigte keine signifikanten Expressionsunterschiede in den verschiedenen Tumorgruppen im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe. Das basale Expressionslevel von *miR-15a-5p* war in Gliomen und nicht-neoplastischem Hirngewebe insgesamt sehr niedrig (Abbildung 3B).

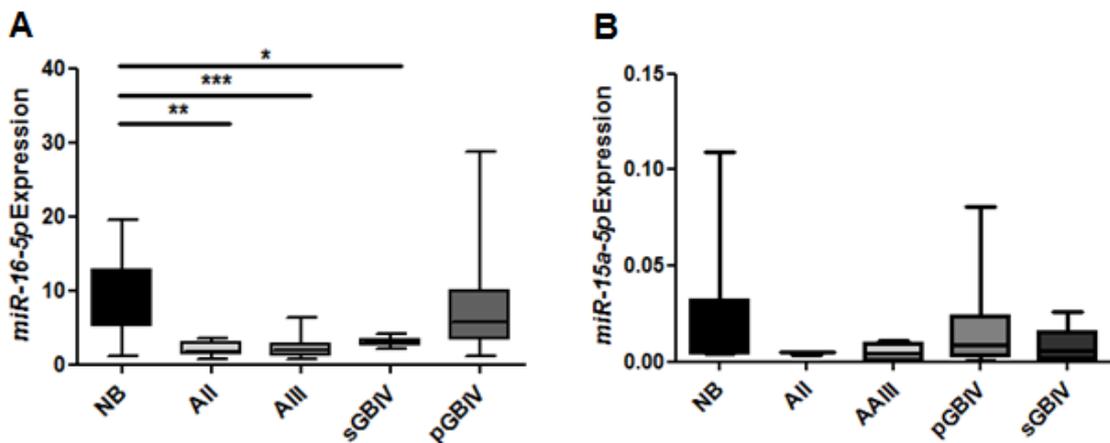


Abbildung 3: Verminderte Expression von *miR-16-5p* in diffusen Astrozytomen (AII), anaplastischen Astrozytomen (AIII), sekundären Glioblastomen (sGBIV) und einem Teil der primären Glioblastome (pGBIV) im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe (aus Forchmann 2011). Gezeigt ist (A) die *miR-16-5p* und (B) die *miR-15a-5p* Expression in Gliomen und nicht-neoplastischem Hirngewebe. Die miRNA-Expression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* wurde mittels qRT-PCR low density Arrays in 9 nicht-neoplastischen Hirngewebsproben (NB), 7 AII, 11 AIII, 8 sGBIV und 54 pGBIV analysiert. Die miRNA-Expression wurde auf das Expressionslevel von vier endogene Kontrollen (*miR-30a-5p*, *miR-30b*, *miR-30c* und *miR-30d*) normalisiert. Die dargestellten Box-Plots zeigen die medianen, unteren und oberen Quartile der normalisierten Expressionswerte in den untersuchten Gruppen und die Fehlerbalken zeigen den höchsten und des niedrigsten Wert. Um die Gruppen statistisch miteinander zu vergleichen wurde der Kruskal-Wallis Test durchgeführt, der für multiples Testen korrigiert wurde. Die Sterne zeigen jeweils signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). NB: Nicht-neoplastisches Hirngewebe, AII: Diffuses Astrozytom WHO-Grad II, AIII: Anaplastisches Astrozytom WHO-Grad III, sGBIV: Sekundäres Glioblastom WHO-Grad IV und pGBIV: Primäres Glioblastom WHO-Grad IV.

1.4.2 Verminderte Viabilität und Proliferation von Gliomzellen nach Überexpression von *miR-16-5p* oder *miR-15a-5p* *in vitro*

Transiente Transfektion von Vorläufern der miRNAs *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* zeigte einen anti-proliferativen Effekt in den drei untersuchten Zelllinien A172, TP365MG und T98G (Forchmann 2011). Der Einfluss der Überexpression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* auf die Viabilität der Zellen wurde anhand eines ATP-basierenden Assays bestimmt. Die Viabilität verringerte sich nach Überexpression von *miR-16-5p* oder *miR-15a-5p* um mehr als 50 % (Abbildung 4). Zusätzlich wurde der Einfluss der Überexpression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* auf die Proliferation der Gliomzellen mit Hilfe eines auf der Inkorporation von BrdU in die DNA basierenden Assays untersucht. Die Proliferation verringerte sich nach Überexpression von *miR-16-5p* respektive *miR-15a-5p* um mehr als 50 % (Abbildung 5).

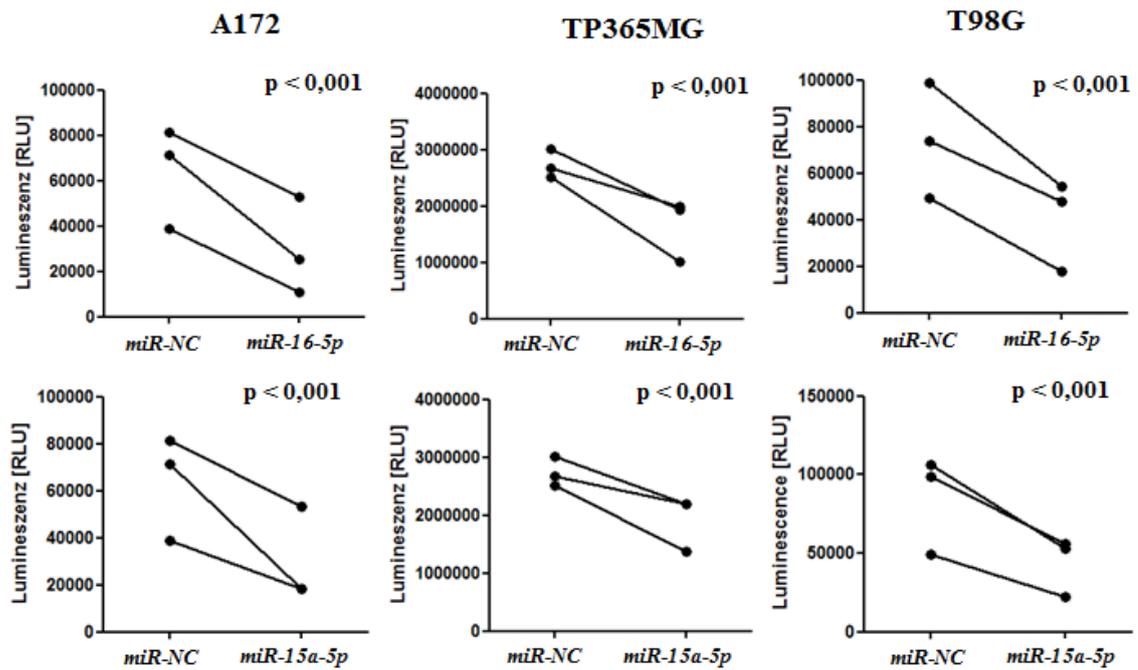


Abbildung 4: Signifikante Reduktion der Viabilitätsrate von A172, T98G und TP365MG Gliomzellen nach Überexpression von *miR-16-5p* oder *miR-15a-5p* Vorläufermolekülen im Vergleich zu Kontrolltransfizierten Zellen. Die Zelllinien A172, TP365MG und T98G wurden transient mit 25 nM *miR-16-5p*, *miR-15a-5p* und *miR-NC* Vorläufermolekülen (Ambion) transfiziert. 72 Stunden nach Transfektion wurde die Viabilität der Gliomzellen mit dem *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* (Promega) bestimmt. Die Punkte in der Grafik repräsentieren fünf Messungen. Es wurden drei unabhängige Experimente für jede Zelllinie durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde ein gemischtes Modell verwendet, wobei die abhängige Variable die Transfektionsgruppe und die unabhängige Variable die Woche der Transfektion war (aus Forchmann 2011).

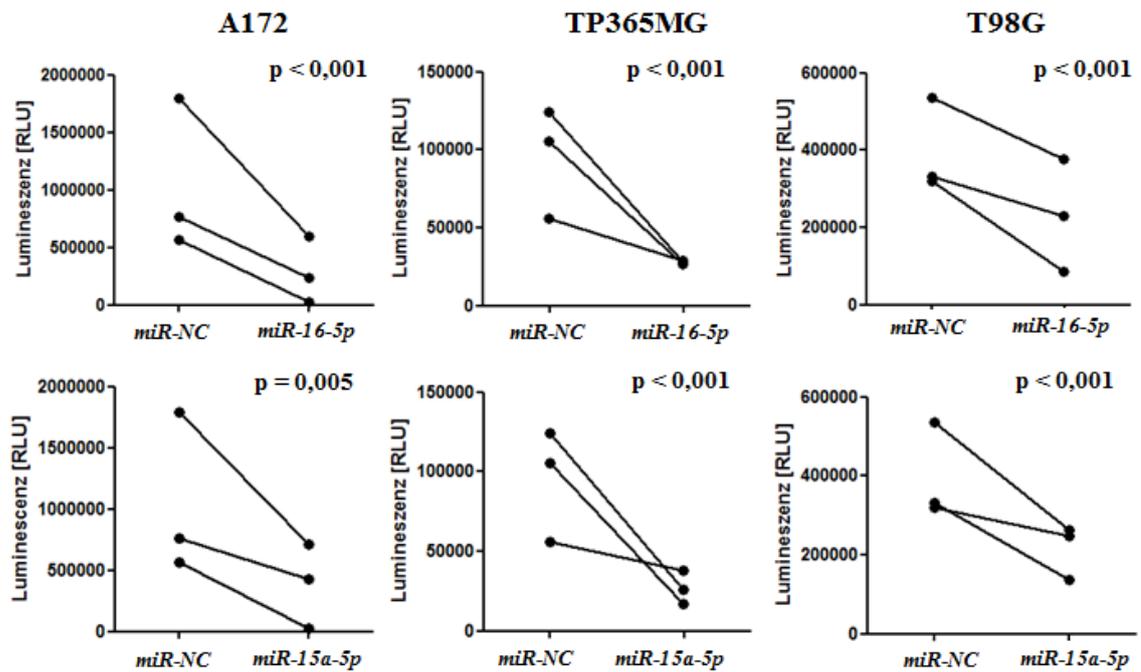


Abbildung 5: Signifikante Reduktion der Proliferation von A172, T98G und TP365MG Gliomzellen nach Überexpression von *miR-16-5p* oder *miR-15a-5p* Vorläufermolekülen im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen. Die Zelllinien A172, TP365MG und T98G wurden transient mit 25 nM *miR-16-5p*, *miR-15a-5p* und *miR-NC* Vorläufermolekülen (Ambion) transfiziert. 72 Stunden nach Transfektion wurde die Proliferationsrate der Gliomzellen mit dem Zellproliferations – Chemolumineszenz ELISA (Roche) bestimmt. Die Punkte in der Grafik repräsentieren fünf Messungen. Es wurden drei unabhängige Experimente für jede Zelllinie durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde ein gemischtes Modell verwendet, wobei die abhängige Variable die Transfektionsgruppe und die unabhängige Variable die Woche der Transfektion war (aus Forchmann 2011).

2 Materialien

2.1 Laborgeräte

In Tabelle 1 sind alle Geräte aufgelistet, die im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit verwendet wurden.

Tabelle 1: Laborgeräte

Hersteller	Gerät / Version
Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA	Bioanalyzer 2100
Applied Biosystems, Foster City, CA	Real time PCR StepOnePlus™ 7900 HAT System
Beckmann Coulter, Brea, CA	ELISA reader, Paradigm™ Detection Platform Inkubator CB150 Vi-CELL™ XR
Biometra GmbH, Göttingen	PCR Thermocycler T3
BioRad GmbH, München	Gelkammer (Protein), Mini Protean Stromversorgung für Gelkammer PowerPAC 3000
Eppendorf AG, Hamburg	Zentrifuge 5424 Tischzentrifuge 5417
Falc Instruments s.r.l., Treviglio, Italy	Thermoblock TD
Fujifilm Europa GmbH, Düsseldorf	Imager LAS-3000 mini
GFL GmbH, Burgwedel	Schüttler 3013 Wasserbad
Hettich GmbH, Tuttlingen	Zentrifuge 46R Kühlzentrifuge EBA 12R
LI-COR Biosciences, Inc., Lincoln, USA	Quantitative Westernblotanalyse - Odyssey CLx
Olympus GmbH, Münster	Fluoreszenz Mikroskop IX 50/ U-RFL-T
PeqLab GmbH, Erlangen	Gel Kammern für Agarose Gele Photometer NanoDrop ND-1000
Sartorius AG, Göttingen	Digitale Waage ALC
Systemec GmbH, Münster	Autoklav VX-150
Telstar Laboratory Equipment B.V.,	Modelle EF/SB 4 und 6

Wörden, NL

VELP Scientifica, Usmate, Italy

Vilbert Lourmet, Paris, France

WTW GmbH, Weilheim

Vortexer Zx3

Transilluminator

pH Meter 525

2.2 Software

Die nachfolgend aufgeführten Computerprogramme wurden für die Datenanalyse verwendet: Image Studio Version 2.1, StepOne™ Software v2.0 und Sequence Scanner v1.0. Für statistische Analysen wurden die Programme GraphPad Prism 5 und IBM SPSS Statistics 21 benutzt. Für die Erstellung von Text, Tabellen, Abbildungen und Literaturverzeichnis der Dissertationsschrift wurden das Microsoft Office 2014 Paket (MS Word, MS Excel und MS PowerPoint), Adobe Photoshop CS3 und Citavi C4 eingesetzt.

2.3 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Verbrauchsmaterialien, die für die Experimente verwendet wurden. Alle Experimente, bei denen käuflich erhältliche Kits verwendet wurden, wurden nach Protokollen gemäß den Herstellerangaben durchgeführt, wenn es im Folgenden nicht anderes beschrieben wurde.

Tabelle 2: Reagenzien und Chemikalien

Hersteller	Reagenzien, Chemikalien, Materialien
Ambion, Huntington, UK	Cy3™Dye-labeled-Pre-miR™-Negative-Control#1 (AM 17120)
	First Choice Human brain total RNA (AM 7962)
	<i>hsa-miR-16-5p</i> ¹ Pre-miR™ miRNA precursors (PM 10339)
	<i>hsa-miR-15a-5p</i> ² Pre-miR™ miRNA

¹ *hsa-miR-16-5p* MIMAT0000069: UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG

(http://www.mirbase.org/cgi-bin/get_seq.pl?acc=MIMAT0000069; 02.12.2014)

	precursors (PM 10235)
	<i>hsa-miR-NC-1</i> Pre-miR TM miRNA
	precursors (AM 17110)
	<i>hsa-miR-NC-2</i> Pre-miR TM miRNA
	precursors (AM 17111)
Amresco, Inc., Solon, OH	Formamid (0606)
AppliChem GmbH, Darmstadt	Ampicillin-Natriumsalz (A0839)
Applied Biosystems, Foster City	Fast Optical 96-Well Platten TaqMan Low Density Custom Arrays (4342265) TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (4366596) TaqMan Universal PCR Master Mix (4326614)
BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ	Human brain total RNA (636530) Human brain total RNA, Cerebellum (636535) Human brain total RNA, Dura Mater (636588) Human fetal brain total RNA (636526) PCR-Platten
Bio-Budget GmbH, Krefeld	Agarose (10-35-1020) DNA Marker 100 bp (85-2000-250) DNA Marker 1 kilo bp (85-1000-250) dNTP (2'-desoxynucleotide-5'-triphosphate)-Mix (80-85011000) Hot Star Taq DNA Polymerase (80-66010100)
BioCat GmbH, Heidelberg	gDNA human adult brain (D1234035-50) gDNA human adult, Occipital lobe (D1234062) gDNA human fetal, Brain (D1244035-50-

² *hsa-miR-15a-5p* MIMAT0000068: UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG
(http://www.mirbase.org/cgi-bin/get_seq.pl?acc=MIMAT0000068; 02.12.2014)

	BC)
	Total RNA human adult normal tissue, Brain (R1234035-50)
	Total RNA human adult normal tissue, Cerebellum left (R1234040-10)
	Total RNA human adult normal tissue, Cerebellum right (R1234041-10)
	Total RNA human adult normal tissue, Cerebral Cortex (R1234042-10-BC)
	Total RNA human adult normal tissue, Corpus callosum (R1234045-10-BC)
	Total RNA human adult normal tissue, Frontal lobe (R1234051-50)
	Total RNA human adult normal tissue, Occipital lobe (R1234062-50)
	Total RNA human adult normal tissue, Parietal lobe (R1234066-50)
	Total RNA human adult normal tissue, Temporal lobe (R1234078-50)
	Total RNA human fetal normal tissue, Cerebellum (R1244039-50-BC)
	Total RNA human fetal normal tissue, Cerebellum left (R1244040-50)
	Total RNA human fetal normal tissue, Cerebellum right (R1244041-50)
Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf	Midori Green Advance (617004)
Carl Roth GmbH, Karlsruhe	Agar (5210.2)
	Bovine serum albumin (BSA) (T844.3)
	Glucose (G-5400)
	Glycin (3790.3)
	Guanidiniisothiocyanat (0017.2)
	Magnesiumchlorid (2189.1)
	Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat (T881.1)
	Natriumchlorid (9265.1)
	Sodiumdodecylsulfat (SDS) (CN30.3)
	TritonX-100 (3051.3)
	Trypton/Pepton vom Casein (8952)
	Tween-20 (9127.1)
Exiqon, Woburn, MA	<i>hsa-miR-16-5p</i> , LNT™ PCR-Primer Set, Uni

	RT (205702)
	<i>hsa-miR-15a-5p</i> , LNT™ PCR-Primer Set, Uni RT (204066)
	Universal cDNA Synthese-Kit (203300)
	<i>U6 snRNA</i> (has, mmu, rno) PCR-Primer Set, Uni RT (203907)
Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	Fast AP™ Themosensitive Alkaline Phosphatase (EF0651)
	Fast Digest NotI (FD0596)
	Fast Digest XhoI (FD0694)
	Prestained Proteinmarker (SM0671)
	RiboLock Rnase Inhibitor (EO0384)
	T4 DNA Ligase (EL0014)
GeneLink, Hawthorne, NY	pd (N ₆), random hexamers phosphorylated (26-4000-03)
Genomed GmbH, Löhne	Jetquick Gel-Extraktions-Kit (420050)
	Jetquick Gewebe-DNA-Extraktions-Kit (450250)
	Jetquick PCR-Aufreinigungs-Kit (410250)
Invitex, Berlin	MSB® Spin PCRpace (1020220300)
Life Technologies, Carlsbad, CA	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (41965062)
	Dulbecco's Phosphate buffered Saline (DPBS) (14190169)
	Fetal calf serum (FCS) (16050-122)
	NuPAGE Tris-Acetate Mini Gels (NP0336BOX)
	OPTI-MEM® Reduced Serum Medium (11058021)
	Platinum® SYBR® Green (11733-046)
	SuperScript® II Reverse Transkriptase (18064014)
	Taq DNA Polymerase (10342046)
	TRIZol®-Reagenz (15596018)
	Trypanblau (0,4 %) (15250-061)

	T4 DNA Ligase (15224017)
LI-COR Biosciences, Inc., Lincoln, NE	Puffer zum Blocken von Membranen (927-40100)
Merck KGaA, Darmstadt	Calciumchlorid (21100) Chloroform (1.02431) Essigsäure (1.00063) Ethanol (844) Isopropanol (1.00979.1000) Methanol (1.06009) Natriumhydrogencarbonat (1.06329) Salpetersäure (1.00456) Salzsäure(1.00317) Tris-Base (2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol)
PAA GmbH, Pasching	Trypsin EDTA (L11-004)
PeqLab GmbH, Erlangen	PeqGOLD Plasmid Mini Prep Kit (12-6942-02)
Promega, Madison, WI	Apo-ONE® Caspase-3/7-Assay (TB295) Dual-Luciferase® Reporter Assay System (E2940)
Qiagen, Hilden	Cy3 AllStar Negative Control siRNA (1027286) Hot Star Taq DNA Polymerase (203205) Hs_HDAC3_1 Flexi Tube siRNA (SI00057316) Hs_HDAC3_4 Flexi Tube siRNA (SI00057337) Hs_MYCBP_6 Flexi Tube siRNA (SI04189675) Hs_MYCBP_7 Flexi Tube siRNA (SI04215764) miRNeays Mini Kit (74104) RNeasy Mini Elute Cleanup Kit (74204) Plasmid Preparation Maxi Kit (12163)

Roche GmbH, Grenach-Wyhlen	cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten, EDTA frei (11836170001) PhosSTOP (04906845001) Zell-Proliferations-ELISA (11669915001)
Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim	Ammoniumacetat (09690) Ammoniumpersulphat (A9164-100G) Borsäure (B7901) Bromphenolblau (B3269-5ML) Dimethylsulfoxid (DMSO) (D5879) Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) (E5134) Glycerol (G6376) Hefeextrakt (70161) Kaliumchlorid (P9541) β -Mercaptoethanol (63690) Natriumacetat (S8750) PIPES (P1851) Ponceau S (P-3504) Trichostatin A (T8552-1MG) Trypton (95039) Xylencyanol Blau (X-4126) 5-AZA-2'-deoxycytidin (A3656-5MG)
Stratagene, Zürich, CH	MVP Total RNA, Human Brain (540005) Universal human Reference RNA (740000)
Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas	WEE1 293T Lysat (sc-127786) Lipofectamin [®] 2000 Transfection Reagent (11668019)
Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA	Pierce [®] BCA Protein Assay Kit (23225)
Whatman GmbH, Dassel	Nitrocellulose Membran (0,2 μ m) (10401396)

2.4 Antikörper

In Tabelle 3 sind alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper aufgelistet.

Tabelle 3: Primäre und sekundäre Antikörper

Hersteller	Antikörper	Produktnummer	Spezies	Verdünnung
<u>Primärantikörper</u>				
Abcam Inc., Cambridge, MA	Anti- β -Aktin	#ab8227	Kaninchen	1:1.000
Cell Signaling, Danvers, MA	BCL2	#2870	Kaninchen	1:1.000
	CDK6	#3136	Maus	1:1.000
	CHK1	#2360	Maus	1:1.000
	Cyclin E1	#4129	Maus	1:1.000
	MYC	#5605	Kaninchen	1:1.000
	HDAC3	#3949	Maus	1:1.000
	MCL1	#4572	Kaninchen	1:1.000
DAKO, Glostrup, DK	Cyclin D3	#M7156	Maus	1:100
Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas	CDC25A ³	#sc-7389	Maus	1:50
	WEE1	#sc-5285	Maus	1:50
<u>Sekundärantikörper</u>				
LI-COR Biosciences, Inc., Lincoln, NE	IRDye 800 CN - gegen Maus		#926-32350	Ziege 1:10.000
	IRDye 800 CN - gegen Kaninchen		#926-32211	Ziege 1:10.000
	IRDye 680 RD –gegen Maus		#926-68070	Ziege 1:10.000
	IRDye 680 RD - gegen Kaninchen		#926-68071	Ziege 1:10.000

2.5 Plasmide

Das Plasmid psiCHECK™-2 von Promega (Madison, WI) wurde als Vektor für die Klonierung der Konstrukte für die Luciferase-Assays verwendet (Abbildung 6).

³ Das Protein zu *CDC25A* heißt *M-phase inducer phosphatase 1* (MPIP1). Im Weiteren werde ich immer das Synonym *CDC25A* für die Proteinbezeichnung verwenden.

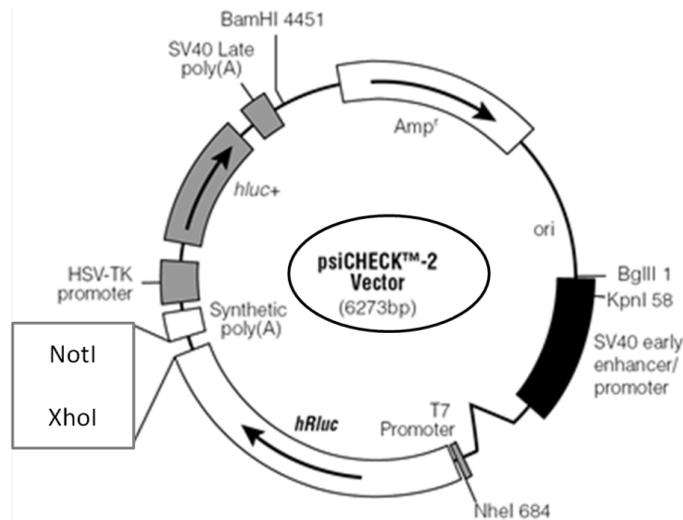


Abbildung 6: Vektorkarte des psiCHECK™-2 Vektors (Promega, Madison, WI), der die Luciferasegene *Renilla* (*hRLuc*) und *Firefly* (*hLuc+*), das Gen für eine Ampicillinresistenz (*Amp^r*) und eine multiple Klonierungsstelle beinhaltet (modifiziert nach www.promega.com).

Das Plasmid pUC19 (Invitrogen, Carlsbad, CA) wurde zum Testen der kompetenten Zellen verwendet.

2.6 Bakterien

Für Klonierungsexperimente wurden ultrakompetente DH5 α -Bakterien als Ausgangsmaterial verwendet (Invitrogen, Carlsbad, CA).

2.7 Zellen

Die Gliomzelllinien A172, T98G, U87MG, U138MG und U251MG wurden von der Firma *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, USA) käuflich erworben. Die Zelllinie TP365MG wurde freundlicherweise von Prof. V. P. Collins (Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt.

2.8 Menschliches Hirntumorgewebe

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tumorgewebeproben entstammten der Tumorgewebekbank des Instituts für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf. Alle Tumoren waren nach den Kriterien der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für die Tumoren des zentralen Nervensystems eingestuft worden (Louis et al 2007b). Teile der Tumorgewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff direkt nach der Operation schockgefroren und bei -80°C anschließend gelagert. Für molekulare Analysen wurden ausschließlich Tumorproben verwendet, die einen histologisch geschätzten Tumorzellgehalt von mindestens 80 % haben. Die Analyse der Patientenproben erfolgte in pseudonymisierter Form gemäß den Vorgaben der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Studien-Nummer 3825 und 3904. Für die Analyse der miRNA-Expression in Gliomen bestand ein projektspezifisches Ethikvotum (Studien-Nummer 3904). Insgesamt flossen in diese Arbeit Expressionsdaten von 70 Gliomen ein, darunter 8 diffuse Astrozytome, 12 anaplastische Astrozytome, 9 sekundäre und 41 primäre Glioblastome.

Für korrelative Analysen der Expression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in Relation zum *IDH1*- und *IDH2*-Mutationsstatus standen Mutationsdaten aus einer Vorarbeit zur Verfügung (Toedt et al. 2011), so dass in insgesamt 70 Tumoren (8 diffuse Astrozytome, 12 anaplastische Astrozytome, 9 sekundäre Glioblastome, 41 primäre Glioblastome) und 4 nicht-neoplastischen Hirngewebsproben die miRNA-Expression mit dem *IDH1/2*-Status korreliert werden konnte (vergleiche Abbildung 7).

2.9 Lösungen

In der folgenden Tabelle 4 sind die Lösungen, Puffer, Gele und Medien aufgelistet, die verwendet wurden.

Tabelle 4: Lösungen, Puffer, Gele und Medien

Name	Zusammensetzung
Formamid Ladepuffer	20 ml Formamid 5 ml H ₂ O eine Spatelspitze Xylencyanol Blau eine Spatelspitze Bromphenolblau
Inoue Transformation Puffer	55 mM MnCl ₂ •H ₂ O 15 mM CaCl ₂ •H ₂ O

	250 mM KCl 10 mM PIPES (0,5 M, pH 6,7 mit 5 M KOH) sterilfiltriert und eiskalt verwendet
Laemmli Puffer (4x)	0,1 M Tris-Base pH 6,8 6 % SDS 40 % Glycerol 0,04 % Bromphenolblau 4 % β -Mercaptoethanol 1 g SDS
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl auf 1 L mit sterilem H ₂ O auffüllen für Agar: 15 g Agar pro 1 L Autoklavieren 50 μ g/ml Ampicillin, wenn Medium handwarm ist
Ponceau S (0,1 % (w/v))	20 % Methanol 1 g Ponceau S 50 ml Essigsäure
RIPA – Puffer	1 x PBS 1 % TritonX-100 0,5 % Natriumdeoxychlorat 2 % SDS 1 cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablette, EDTA frei pro 10 ml 1 mini PhosSTOP Tablette pro 10 ml
Laufpuffer für Tris-Gele (10x)	0,25 M Tris-Base 2 M Glycin
SOB Medium	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 10 ml von 250 mM KCl auf pH 7,0 mit 5 N NaOH einstellen, auf 1 l mit destilliertem H ₂ O auffüllen, sterilisieren durch autoklavieren, Zugabe von 5 ml einer 2 M sterilen MgCl ₂ - Lösung

TAE Puffer (50x)	2 M Tris-Base 1 M Essigsäure 50 mM EDTA pH 8,0
TBE Puffer (1x)	0,89 M Tris-Base 0,89 M Borsäure 20 mM EDTA pH 8,0
TBS Puffer (10x)	1,37 M NaCl 0,2 M Tris-Base pH 7,6
TE Puffer (1x)	10 mM Tris-Base 1 mM EDTA pH 7,5
Transferpuffer (1x)	25 mM Tris-Base 0,1 M Glycin

2.10 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotidsequenzen (Tabelle 5) wurden selbst entworfen und von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany) synthetisiert.

Tabelle 5: Oligonukleotide. # 1, qRT-PCR; 2, 3: Luciferasereporter-Gen-Assay (2: mit beiden *wt* Bindestellen und 3: mit der mutierten Bindestelle für *miR-16-5p* und *miR-15a-5p*; kleine Buchstaben = *XhoI/NotI* Schnittstelle); 4: cDNA-Synthese-Qualitätskontroll-PCR, 5: Kolonie-PCR. * PCR-Produktlänge ist abhängig von dem inserierten DNA-Fragment. ** Primerverdünnungen für Gene, die in der qRT-PCR eingesetzt wurden (1). Genbanknr. = Genbanknummer, Chr = Chromosom, A = Anmerkung, Prod = PCR Produkt, Anw = Anwendung, Verd = eingesetzte Primerverdünnung, f = forwards, r = rückwärts.

Gen	Genbanknr	Chr	Primersequenz	A	Prod	Anw	Verd**
<i>CDK6</i>	NM_001259.6	7q21.2	5'-TGCACAGTGTACGAACAGA 5'-ACCTCGGAGAAGCTGAAACA	f r	150 bp	1	300:300
<i>CCND3</i>	NM_001136017.3	6p21.1	5'-CATGCCAGACCTTTTGGC 5'-CAGTCCACTTCAGTGCCAGT	f r	176 bp	1	300:300
<i>CCNE1</i>	NM_001238.2	19q12	5'-CAGATTGACAGAGCTGTTGGA 5'-TCCCCGTCTCCCTATAACC	f r	199 bp	1	300:300
<i>CDC25A</i>	NM_001789.2	3p21.31	5'-TGCAAGCGTGCATTGTTG 5'-AGCTAGGGGGCTCACAGTAA	f r	194 bp	1	300:300
<i>WEE1</i>	NM_003390.3	11p15.4	5'-GAGTACTGCGCAGATGACCA 5'-GAGGAGTCTGTCGCACATCA	f r	154 bp	1	300:300
			5'-gggtatctcgagGACAAGAGGAAGCTAGGTTG 5'-ggctatcgggccgcAACACAAGTCAAAGACAAGTGC	f r	1108 bp	2	
<i>CHEK1</i>	NM_001114122.2	11q24.2	5'-TTACTGCAATGCTCGCTGGA 5'-TGGTGTGTACAGATCTCCCA	f r	270 bp	1	300:300
			5'-gggtatctcgagCTGGGAATCCTGGTGAATAT 5'-ggctatcgggccgcGTTTTGAAGCTGGCTTCGCT	f r	461 bp	2	
			5'-gggtatctcgagCTGGGAATCCTGGTGAATATAGG TAGTAGCTGTTGAC 5'-ggctatcgggccgcGTTTTGAAGCTGGCTTCGCT	f r	461 bp	3	
<i>BCL2</i>	NM_001127240.2	19q13.32	5'-GAGGATTGTGGCCTTCTTTG 5'-ACAGTTCACAAAGCATCCCA	f r	170 bp	1	300:300
<i>MCL1</i>	NM_021960.4	1q21.3	5'-TCTCTCGGTACCTTCGGGAG 5'-AACCCATCCCAGCCTCTTTG	f r	400 bp	1	300:300
<i>MYC</i>	NM_000008.11	8q24.21	5'-GAGCTGCTTCGCCTAGAAGT 5'-TGGGAACCCGTACAAAAGCA	f r	582 bp	1	300:300
<i>HDAC3</i>	NM_003883.3	5q31.3	5'-GGAGCTGGACACCCTATGAA 5'-GACTCTTGGTGAAGCCTTGC	f r	199 bp	1	300:300
<i>DLEU2</i>	NR_002612.1	13q14.2	5'-GAGGGCAATAAATGCCACAT 5'-GTGGTCCAGAAAACCTGCTC	f r	109 bp	1	900:900

<i>ARF1</i>	NM_001658.3	1q42.13	5'-GACCACGATCCTCTACAAGC 5'-TCCCACACAGTGAAGCTGATG	f r	111 bp	1	600:600
<i>B2M</i>	NM_004048.2	15q21.1	5'-GTTGCTCCACAGGTAGCTCTAG 5'-ACAAGCTTTGAGTGCAAGAGATTG	f r	123 bp	4	
			5'-GTCTCGTCCGTGGCCTTAG 5'-CATTCTCTGCTGGATGACGTGAG	f r	110 bp	4	
psiCHE CK2	Plasmid		5'-AGGACGCTCCAGATGAAAT 5'-CAAACCTAACCACCGCT	f r	*	5	

2.11 Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierungen wurden von der Firma StarSeq (Mainz) durchgeführt.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Nukleinsäureextraktion aus Zellen

Aus *in vitro* kultivierten Zellen wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des TRIzol®-Reagents (Invitrogen) gemäß Herstellerangaben extrahiert. Nach der Extraktion wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in 15 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Anschließend wurde die RNA-Konzentration mit dem NanoDrop-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Zusätzlich wurde die RNA-Qualität getestet, indem 1 µg RNA auf einem einprozentigen Agarosegel aufgetrennt wurden.

3.1.2 Reverse Transkription

3.1.2.1 Umschreiben von RNA in cDNA

Zum Umschreiben der extrahierten RNA in cDNA wurde die SuperScript® II Reverse Transkriptase verwendet. 3 µg Gesamt-RNA wurden in 30,4 µl RNase-freiem Wasser bei 70°C für 5 Minuten linearisiert und anschließend die RNA-Lösung für 5 Minuten auf Eis gekühlt. Danach wurde der Reaktionsmix zugegeben (Tabelle 6).

Tabelle 6: Reaktionsmix für das Umschreiben von RNA in cDNA.

Reaktionsmix	
1,7 µl	BSA (1 mg/ml)
0,4 µl	Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) (0,1 M)
2,5 µl	dNTPs (25 mM)
10 µl	First strand buffer
3 µl	pd(N) ₆ (1,5 µg/µl)
1 µl	RiboLock RNase Inhibitor
1 µl	SuperScript® II Reverse Transkriptase (200 U/µl)

Die cDNA-Synthese wurde für 50 Minuten bei 42°C in einem PCR-Gerät durchgeführt. Die anschließende Inaktivierung des Enzyms erfolgte für 10 Minuten bei 80°C. Zur Überprüfung der Qualität der cDNA wurde sowohl ein Amplikon aus dem 3'-Bereich der β 2-Microglobulin-cDNA als auch aus dem 5'-Bereich mittels PCR vervielfältigt und nach Auftrennung über ein Agarosegel das Verhältnis der beiden PCR-Produkte bestimmt.

3.1.2.2 MiRCURY LNATM Universal RT - Einzelstrangsynthese

Das miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR-System (Exiqon, Woburn, MA) ist ein miRNA-spezifisches, LNATM-basierendes System, welches für eine sensitive und präzise Detektion von microRNAs mittels quantitativer Realtime-PCR entwickelt wurde. Die Methode basiert auf der reversen Transkription mittels LNATM verstärkter poly-T-Primern. Die cDNA-Synthese wurde gemäß dem Protokoll von Exiqon durchgeführt.

3.1.3 Quantitative Realtime-PCR

Zur quantitativen Genexpressionsanalyse wurde eine Fluoreszenz-basierte quantitative Realtime-PCR verwendet, welche auf dem PCR-Gerät StepOnePlusTM qRT-PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) durchgeführt wurde. Dabei wird ein fluoreszierender Farbstoff (wie beispielsweise SybrGreen[®]) in die neu synthetisierte doppelsträngige DNA eingelagert und ermöglicht so die Quantifizierung der DNA in Echtzeit. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines qRT-PCR Laufs, der normalerweise aus 40 Zyklen besteht, wird anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Dieser Wert wird durch den c_t -Wert (*cycle of threshold*) angegeben, der aussagt in welchem Zyklus der PCR das Fluoreszenzsignal sich gerade deutlich von der Hintergrundstrahlung abhebt. Je niedriger der c_t Werte ist, also je eher sich das Fluoreszenzsignal von der Hintergrundstrahlung abhebt, desto mehr Kopien des Zielgenes sind zu Beginn der Reaktion in der Probe vorhanden.

Für die Berechnung wurde der *fold change* mit der $\Delta\Delta c_t$ -Methode ermittelt (Livak und Schmittgen 2001). Als erstes wurde der Mittelwert der einzelnen c_t -Werte der Replikate der Zielgene und des Referenzgens errechnet. Dann wurden die Δc_t Werte berechnet,

indem die c_t -Werte des Referenzgens von den c_t -Werten des Zielgenes subtrahiert wurden. Anschließend wurde die Differenz der Δc_t -Werte der untersuchten Gruppen gebildet, wodurch man den $\Delta\Delta c_t$ -Wert erhält. Daraufhin wurde der umgekehrte negative Logarithmus der $\Delta\Delta c_t$ -Werte gebildet und man erhält den $\Delta\Delta c_t (2^{-\Delta\Delta c_t})$ -Wert, welcher der *fold change* der zu untersuchenden Probe ist.

3.1.3.1 Quantitative Realtime-PCR für die Expressionsanalyse von RNAs

Der Mastermix für die qRT-PCR-Analyse wurde wie in Tabelle 7 und

Tabelle 8 aufgelistet, angesetzt und durchgeführt. Für die qRT-PCR wurde die cDNA der zu untersuchenden Proben im Verhältnis Probe zu Wasser 1:25 verdünnt. Das optimale Primerverhältnis wurde ermittelt, indem eine Primermatrix angefertigt wurde. Hierzu wurden in einer qRT-PCR-Analyse der Vorwärts- und der Rückwärts-Primer in verschiedenen Konzentrationen zueinander getestet, um das beste Verhältnis der Primer zu bestimmen. Als cDNA wurde *human universal RNA* (Stratagene, Zürich, CH) benutzt. Die mRNA-Expression des *Adenosine-diphosphate-ribosylation factor 1* (*ARF1*)-Gens wurde als Referenz in der qRT-PCR-Analyse verwendet, da *ARF1* relativ gleichbleibend in verschiedenen Gliomen und Zelllinien exprimiert wird. ROX wurde als passiver Referenzfarbstoff eingesetzt, um eine robuste Detektion der Fluoreszenzsignale über die gesamte Platte zu erhalten.

Tabelle 7: Reaktionsmix für die qRT-PCR-Reaktion.

Reaktionsmix	
12,5 µl SybrGreen® Mix	} insgesamt 20 µl SybrGreen® Mix mit Primern
0,5 µl ROX	
Primer vorwärts	
Primer rückwärts	
Wasser	
5 µl verdünnte cDNA	

Tabelle 8: qRT-PCR-Programm für die qRT-PCR-Reaktion.

PCR Programm	
90°C	für 10 min
95°C	für 15 sek
60°C	für 1 min
} 40 Zyklen	
Schmelzkurve	
4°C	für ∞

3.1.3.2 TaqMan Low Density Array zur Expressionsanalyse von miRNAs in primären Hirntumoren

Für die Bestimmung der Expressionsprofile der miRNAs von primären Tumoren wurde der TaqMan Low Density Array (Applied Biosystems, Foster City, CA) verwendet. Der Array besteht aus einem stem-loop Primerpool für 365 miRNAs und zwei endogenen Kontrollen für die Normalisierung der reversen Transkription. Der TaqMan Low Density Array wurde für eine zweistufige RT-PCR designed. Im ersten Schritt wird die cDNA von der totalen DNA mit Hilfe des TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) unter Verwendung der stem-loop Primer, die spezifisch für die 365 miRNAs sind, in einer Reaktion revers transkribiert. Im zweiten Schritt wird die cDNA mit dem TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem, Foster City, CA) amplifiziert. Hierzu wurden die probenspezifischen PCR-Gemische in die bereits mit dem TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA) geladenen TaqMan Low Density Array gegeben. Für die quantitative RT-PCR wurde die $\Delta\Delta C_t$ Methode angewendet. Die TaqMan MicroRNA Cards wurden auf dem 7900 HAT System (Applied Biosystems, Forster City, CA) analysiert. Diese Methode wurde nach Herstellerangaben von Dr. Franziska Liesenberg im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt (Liesenberg et al. 2012). Für die Auswertung, die von Dr. Marc Zapatka (DKFZ Heidelberg, Deutschland) durchgeführt wurde, wurde die Software StatMiner verwendet.

3.1.3.3 Quantitative Realtime-PCR für die Expressionsanalyse von miRNAs

In der LNATM PCR-Amplifikation sind beide PCR-Amplifikationsprimer für die zu untersuchende miRNA spezifisch und mit LNATM optimiert. Die cDNA wurde im Verhältnis 1:38 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Dann wurde der Reaktionsmastermix angesetzt (Tabelle 9) und die jeweilige verdünnte cDNA zugegeben.

Tabelle 9: Reaktionsmix und qRT-PCR-Programm für die qRT-PCR-Reaktion von miRNA nach dem Protokoll von Exiqon.

Reaktionsmix	PCR Programm
5 µl SybrGreen® Mix	95°C für 10 min
1 µl PCR Primermix	95°C für 10 sek
0,2 µl ROX	60°C für 1 min
3,8 µl verdünnte cDNA	Kühlzeit von 95° auf 60°C 1,6°C/s
	Schmelzkurve
	4°C für ∞

3.2 Zellkulturbasierende Methoden

3.2.1 Kultivierung von Gliomzellen *in vitro*

Die Gliomzellen wurden in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem Kälberserum (*fetal bovine serum*, FCS) und 1 % (v/v) Penicillin G / Streptomycin (P/S) bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Um die Zellen in Kultur zu halten, wurden sie zweimal in der Woche passagiert. Hierzu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in einer adäquaten Menge Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst. Danach wurden die Zellen im Vi-CELLTM XR mithilfe einer Trypanblaufärbung gezählt und in neuem Medium ausgesät (Tabelle 10).

Zur Kryokonservierung wurden die Gliomzellen nach Tabelle 10 in DMEM mit 10 % FCS, 1 % P/S und 10 % DMSO in 1,5 ml Nunc-Röhrchen eingefroren. Erst wurden die

Zellen für 24 Stunden bei -20°C, dann für 24 Stunden bei -80°C und anschließend bis zur erneuten Verwendung im flüssigen Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff genommen und zügig im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Danach wurden die Zellen in 10 ml DMEM mit 10 % FCS und 1 % P/S aufgenommen, bei 5.000 x g für 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen wiederum in 10 ml DMEM mit 10 % FCS und 1 % P/S aufgenommen und in eine Zellkulturschale zum Anwachsen der Kultur gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt.

Tabelle 10: Zellzahl für die Subkultivierung und Kryokonservierung von Gliomzellen.

Zelllinie	Zellzahl für die Subkultivierung in einer 75 cm² Flasche	Zellzahl für die Kryokonservierung
A172	1.000.000	2.500.000
TP365MG	500.000	1.250.000
T98G	525.000	1.875.000
U87MG	1.000.000	5.000.000
U251MG	1.000.000	2.500.000
U138MG	700.000	2.500.000

3.2.2 Transiente Transfektion von Gliomzellen mit miRNA-Vorläufermolekülen

Um miRNAs in Gliomzellen überzuexprimieren, wurden die Zellen mit *pre-miRNAs* transient transfiziert. Die Gliomzelllinien wurden in 6-, 12-, oder 96-Well-Platten in DMEM mit 10 % FCS und 1 % P/S ausgesät. 24 Stunden nach der Aussaat wurden die Zellen mit den miRNA-Vorläufermolekülen von *miR-16-5p* oder *miR-15a-5p* (Ambion, Huntington, UK) mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine[®] 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) nach Herstellerangaben in DMEM mit 10 % FCS transfiziert. Als Kontrolle wurde eine entsprechende Menge an Wells parallel mit einer kommerziell erhältlichen Kontrolle, *Cy3 labeled pre-miRTM negative control* (Ambion, Huntington, UK), transfiziert, um Nebeneffekte, die durch die Transfektion entstehen, zu identifizieren. Des Weiteren wurde die Cy3-markierte Negativkontrolle verwendet,

um die Transfektionseffizienz zu bestimmen. Die Transfektionsansätze wurden nach Herstellerangaben angesetzt. Es wurden jeweils zwei Ansätze durchgeführt, im ersten Ansatz wurden 50 nM *miR*-Vorläufermoleküle in einer für die Wellgröße geeigneten OPTI-MEM[®] Menge gegeben. Für den zweiten Ansatz wurden Lipofektamin und OPTI-MEM[®] zusammengegeben. Beide Ansätze wurden für 5 Minuten bei RT inkubiert und anschließend zusammengegeben. Dann wurde der Reaktionsmix für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium, in dem die Zellen ausgesät wurden, wurde abgenommen und frisches Medium ohne P/S auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde der Transfektionsmix tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. 18 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium zu DMEM mit 10 % FCS und 1 % P/S gewechselt. Danach wurden 24, 48 oder 72 Stunden nach Transfektion, abhängig vom jeweiligen Assay, die Zellen geerntet oder mit dem entsprechenden zellbiologischen Assay analysiert.

3.2.3 siRNA-mediierter Knock-down von MYC und HDAC3

Die Gene MYC und HDAC3 sind in Gliomen überexprimiert. Um die Funktion der Gene zu untersuchen, wurden sie mit spezifischen siRNAs ausgenocked. Hierzu wurden Gliomzellen mit spezifischen siRNAs gegen MYC und HDAC3 transient transfiziert. Die Gliomzelllinien wurden in 6-Well-Platten in DMEM mit 10 % FCS und 1 % P/S ausgesät. 24 Stunden nach der Aussaat wurden die Zellen mit den siRNAs (Quiagen, Hilden) mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine[™] 2000 nach Herstellerangaben in DMEM mit 10 % FCS transfiziert. Um Nebeneffekte, die durch die Transfektion entstehen, zu identifizieren, wurde eine entsprechende Menge an Wells parallel mit einer kommerziell erhältlichen *Cy3 AllStar Negative Control siRNA* (Quiagen, Hilden) transfiziert. Des Weiteren wurde die Cy3-markierte Negativkontrolle zur Bestimmung der Transfektionseffizienz verwendet. Die Transfektionsansätze wurden nach Herstellerangaben angesetzt. Es wurden jeweils zwei Ansätze durchgeführt, im ersten Ansatz wurden 1 µg siRNA-Moleküle in einer für die Wellgröße geeigneten OPTI-MEM[®] Menge gegeben. Für den zweiten Ansatz wurden Lipofektamin und OPTI-MEM[®] zusammengegeben. Beide Ansätze wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zusammengegeben. Dann wurde der Reaktionsmix für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium, in dem die Zellen

ausgesät wurden, wurde abgenommen und frisches Medium ohne P/S auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde der Transfektionsmix tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. 18 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium zu DMEM mit 10 % FCS und 1 % P/S gewechselt. 24 bis 72 Stunden nach Transfektion, abhängig vom jeweiligen Assay, wurden die Zellen geerntet oder mit dem entsprechenden zellbiologischen Assay analysiert.

3.2.4 Behandlung von Gliomzellen mit 5-AZA-2'-Deoxycytidin oder Trichostatin A

3.2.4.1 Behandlung mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-AZA-2'-Deoxycytidin

Für die Untersuchung des Einflusses einer verstärkten DNA-Methylierung auf die Expression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* wurden Gliomzellen mit verschiedenen Konzentrationen des DNA-Methyltransferase (DNMT)-Inhibitors 5-AZA-2'-Deoxycytidin (250 nM, 500 nM, 1 µM, 2 µM) für 72 Stunden mit einem Mediumwechsel nach jeweils 24 Stunden kultiviert. Die aus diesen Zellen isolierte RNA wurde für die eigenen Untersuchungen freundlicherweise von Frau Dr. Marietta Wolter zur Verfügung gestellt.

3.2.4.2 Behandlung mit dem Histondeazetylase (HDAC)-Inhibitor Trichostatin A

Zur Analyse des Einflusses von Histonmodifikationen auf die Expression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* wurden Gliomzellen mit oder ohne 1 µM Trichostatin A für 36 Stunden kultiviert. Die aus den behandelten und den unbehandelten Zellen isolierte RNA wurde freundlicherweise von Frau Dr. Franziska Liesenberg für die eigenen Analysen zur Verfügung gestellt.

3.2.5 Apoptoseassay

Um den Effekt einer Überexpression von *miR-16-5p* beziehungsweise *miR-15a-5p* auf die Apoptoserate von Gliomzellen zu untersuchen, wurde die Caspase-3/7-Aktivität mittels des *Apo-ONE Homogenous Caspase-3/7-Assay* (Promega) bestimmt. Die

Caspase-3/7-Aktivität ist ein wichtiges Kennzeichen der Apoptose. Beide Caspasen, Caspase-3 und Caspase-7, sind Cysteinproteinasen, die Proteine am C-terminalen Ende der Aminosäuresequenz DEVD (asp-glu-val-asp) schneiden. Die aus den permeabilisierten Zellen freigesetzten Caspasen spalten dann das zugegebene Substrat Rhodamin 110, welches ein profluoreszierendes Substrat ist, das an DEVD gekoppelt ist. Nach der Spaltung des DEVD-Peptids durch die Caspasen 3 und 7 wird das Rhodamin 110 fluoreszent und kann bei einer maximalen Emission von 561 nm Wellenlänge nach einer Anregung mit 499 nm Wellenlänge quantitativ gemessen werden. Der Assay wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Gliomzellen wurden mit *miR-16-5p*, *miR-15a-5p* und Kontroll-Vorläufer-miRNAs (*miR-NC*) transfiziert, wie in 3.2.2 beschrieben. 72 Stunden nach der Transfektion wurde die Caspase-3/7-Aktivität gemessen.

3.3 Proteinbiochemische Analysen

3.3.1 Proteinextraktion aus Zellen

Als erstes wurden die zu erntenden Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in 500 µl RIPA-Puffer aufgenommen und lysiert. Das Lysat wurde bei 12.000 x g bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert, um die Zelltrümmer aus dem Proteinlysate zu entfernen. Die Proteinlysate wurden anschließend im Ultraschallbad behandelt (Amplitude 40 Prozent für 30 Sekunden), um die DNA und RNA in dem Lysat zu zerkleinern. Danach wurde die Proteinkonzentration im Lysat mit dem Pierce[®] BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) gemäß den Herstellerangaben bestimmt. Gelagert wurden die Proteine bis zu ihrer Verwendung bei -80°C.

3.3.2 Westernblot-Analysen

Mit der Westernblot-Technik können Proteine aus Proteingemischen qualitativ und quantitativ analysiert werden. Als erstes wurden die Proteine mit einer denaturierenden SDS-PAGE (engl.: *Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoreses*) aufgetrennt. Hierfür wurden die Proteinproben vor dem Auftragen in die Gelvertiefungen des Sammelgels mit Ladepuffer versetzt und bei 95°C für 10 Minuten

denaturiert. Nach dem Auftragen in die entsprechenden Gelkammern wurden die Proteine konstant bei 150 V für 70 Minuten nach ihrer Größe aufgetrennt. Um die Größe der Proteine auf dem Gel bestimmen zu können, wurde ein entsprechender Größenstandard aufgetragen, der wie die zu untersuchenden Proteine in der SDS-PAGE seiner Größe nach aufgetrennt wurde. Nachdem die kleinen Proteine das untere Ende der SDS-PAGE erreicht hatten, wurden die Proteine des Polyacrylamidgels mit Hilfe der Elektrotransfer-Methode bei 250 mA für 90 Minuten bei 4°C auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Proteine wurden so von dem Gel positionsgetreu und irreversibel auf eine Membran mit einer hohen Proteinbindungskapazität übertragen und immobilisiert (Blotting). Dann wurden die Proteine auf der Membran mit dem Azofarbstoff Ponceau S sichtbar gemacht. Hierfür wurde die Nitrozellulosemembran für 3 Minuten in der Ponceau S Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde nach der Begutachtung der Proteinbanden die Färbung mit Wasser ausgewaschen. Zur Minimierung unspezifischer Bindungen des Antikörpers, wurde die Membran mit einem Blocking Puffer (Li-COR Biosciences, Inc., Lincoln, NE) für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch das Blocken wird die Sensitivität durch die Reduktion des Hintergrundes erhöht, also das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis hin zum Signal verschoben und die spezifische Bindung des Primärantikörpers durch die Minimierung von unspezifischen Interaktionen gefördert. Nach dem Blocken wurde die Membran mit den spezifischen Primärantikörpern über Nacht bei 4°C in der entsprechenden Verdünnung in TBST inkubiert (Tabelle 3). Primärantikörper binden an das entsprechende Antigen auf der Nitrozellulosemembran. Überschüssige, das heißt nicht gebundene Primärantikörper wurden anschließend durch dreimaliges Waschen für 20 Minuten in TBST bei Raumtemperatur entfernt, bevor der sekundäre Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur zugegeben wurde (Tabelle 3). Die Fluoreszenzsignale auf der Membran wurden nach wiederholten Waschschritten mit TBST (3 x 20 Minuten) mit Hilfe des Odyssey CLx Systems (Li-COR) detektiert. Die gemessene Fluoreszenz ist direkt proportional zu der Menge an Antigen auf dem Westernblot. Ein Vorteil der Quantifizierung mit dem Odyssey-System ist, dass sich die Signalintensität der Protein-Antikörper Bindung über die Zeit nicht verändert. Die Fluoreszenzsignale sind somit konstant und aufgrund ihres großen quantitativen Bereiches nicht sehr schnell gesättigt. Es können so sowohl sehr schwach als auch sehr

stark exprimierte Proteine im kleinst beziehungsweise größt möglichen dynamischen Bereich detektiert und quantifiziert werden.

Zusätzlich zu dem zu untersuchenden Protein wurde zur Normalisierung das hoch konservierte Protein β -Aktin, das in allen Proteinproben gleichmäßig exprimiert ist, verwendet. Die Expression des zu untersuchenden Proteins wurde auf die Expression von β -Aktin normalisiert, da davon auszugehen ist, dass β -Aktin in allen Zellen in ähnlicher Stärke exprimiert wird. Die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale wurde mit dem Programm Image Studio Software v3.1 vorgenommen.

3.4 Luciferase Reporter-gen-Assay

Um die direkte Bindung von miRNAs in der 3'-UTR von potentiellen Targetgenen zu bestimmen, wurde das Dual-Glo® Luciferase-Assay System (Promega) verwendet. Hierzu wurde die Reporter-genexpression gemessen, die dann Rückschlüsse auf eine direkte Bindung zulässt. Als erstes wurden die jeweiligen 3'-UTRs als *wild type (wt)* oder mit der oder den mutierten Bindestellen für die zu untersuchende miRNA in den psiCHECK™-2 Vektor (Promega) kloniert. Anschließend wurde das Plasmid mit den zu untersuchenden miRNAs beziehungsweise den entsprechenden Kontrollen in Gliomzellen kotransfiziert. Der psiCHECK™-2 Vektor enthält die Reporter-gene für die *Firefly (Photinus pyralis)* und *Renilla (Renilla reniformis)* Luciferase. Der Reporter-assay ermöglicht die unabhängige Quantifizierung der Lumineszenzsignale von sowohl der *firefly* als auch der *Renilla* Luciferase in einer Probe. Beide Luciferasen benötigen keine post-transkriptionalen Veränderungen für ihre enzymatische Aktivität und sind somit direkt nach der Translation aktiv. Die primäre Reporteraktivität der *Renilla* Luciferase korreliert mit den spezifischen Effekten in den Zellen und die Aktivität des Kontrollreporter-gens *firefly* dient als interne Kontrolle, um die Ergebnisse auf die Gesamtlumineszenz der Zellen zu normalisieren.

3.4.1 Herstellung kompetenter Zellen

Für die Klonierungsexperimente wurden DH5 α kompetente Bakterienzellen (Invitrogen) verwendet. Es wurde aus einer Einzelkolonie der DH5 α kompetenten Bakterienzellen eine Übernachtskultur in SOB-Medium angeimpft. Über Nacht wurde

die Kultur bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei leichtem Schütteln (250 – 300 rpm) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden drei 1 l Kolben mit 250 ml SOB-Medium gefüllt, die Kulturen mit 14 ml, 9 ml und 2 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 18 – 22°C und moderatem Schütteln inkubiert. Wenn eine Kultur eine OD (engl.: *optical density* = optische Dichte) von OD₆₀₀ = 0,55 hatte, wurden die Bakterien geerntet. Hierzu wurden die Bakterien bei 2.500 x g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die Pellets getrocknet. Dann wurden die Zellen in 80 ml eiskaltem Inoue Transformationspuffer resuspendiert und anschließend bei 2.500 x g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Plastikgefäße mit dem Deckel nach unten in eine Eisgefäß gestellt um den Puffer möglichst komplett aus dem Gefäß zu bekommen. Dann wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem Inoue Transformationspuffer, der 1,5 ml DMSO enthält, resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis ruhen gelassen. Anschließend wurden die Bakterienzellen in 200 µl Aliquots abgefüllt, schockgefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Die Transformationseffektivität wurde durch eine Testtransformation mit der Vektor-DNA von pUC19 getestet und die Effizienz gemäß den Herstellerangaben ermittelt.

3.4.2 Klonierung der 3'-UTR-Konstrukte

Für die Klonierung wurden die jeweils relevanten Teile die 3'-UTR der zu untersuchenden potentiellen Targetgene in den psiCHECKTM-2 Vektor kloniert. Als erstes wurden die entsprechenden DNA-Fragmente der zu untersuchenden 3'-UTRs mittels PCR vervielfältigt beziehungsweise von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) synthetisiert. Anschließend wurde das PCR-Produkt nach Aufreinigung (Jetquick PCR Aufreinigungs Kit) mit den beiden Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *NotI* verdaut. Die Vektor-DNA wurde mit denselben Endonukleasen *XhoI* und *NotI* geschnitten, anschließend dephosphoryliert und über ein Agarosegel aufgereinigt (Gelextraktions Kit). Dann wurde das PCR-Produkt mittels T4 Ligase in den Vektor ligiert. Die Ligation wurde in sich wiederholenden Zyklen bei 16°C, 20°C und 37°C für jeweils 1 Minute durchgeführt. Dann wurde der Vektor in die kompetenten DH5α Bakterien transformiert. Für die Transformation wurden 100 µl der kompetenten DH5α Bakterienzellen auf Eis für 30 Minuten aufgetaut. Dann wurden 10 µl des

Ligationsansatzes zu den Bakterien gegeben und weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die DNA mittels Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden in die Zellen gebracht. Danach wurden die Zellen für 1 Minute auf Eis inkubiert, 250 µl antibiotikafreies Medium zugegeben und für 1 Stunde bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen auf LB Platten, die 50 mg/ml Ampicillin enthielten, ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Bakterienkolonien gepickt und mittels Kolonie-PCR getestet, ob sie das Plasmid mit der entsprechenden 3'-UTR eingebaut hatten. Anschließend wurde das Plasmid mittels Übernachtskultur vervielfältigt. Hierzu wurden in 15 ml sterilen Plastikröhrchen 3 ml LB-Medium mit 50 mg/ml Ampicillin und einer vorher positiv auf das Insert getesteten Kolonie gegeben. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37°C bei moderatem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Übernachtskulturen mit der Mini-Plasmid-DNA Präparation (PeqLab) aufgereinigt. Anschließend wurde die in der Mini-Präparation gewonnene DNA mit den beiden Insertionsenzymen *XhoI* und *NotI* zur Kontrolle verdaut. Man erhält bei positivem Verdau einen linearisierten Vektor und das ligierte PCR-Fragment. Positiv getestete Kolonien wurden sequenziert um die basengenaue Richtigkeit der 3'-UTR festzustellen (siehe Kapitel 2.11).

3.4.3 Dual-Glo® Luciferase Assay System

Das in 3.4.2 hergestellte Plasmid wurde mit der zu untersuchenden miRNA in T98G Gliomzellen kotransfiziert. Hierzu wurden 8.000 Zellen in einer 96-well Platte ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert. Dann wurden die Zellen mit der Vektor-DNA und der miRNA wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, kotransfiziert. Hierzu wurden für den ersten Ansatz 100 ng Plasmid-DNA mit 50 nM miRNA-Vorläufermoleküle in OPTI-MEM® mit einem Gesamtvolumen von 25 µl gegeben. Für den zweiten Ansatz wurden 0,5 µl Lipofektamin und 24,5 µl OPTI-MEM® zusammenpipettiert. Beide Ansätze wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend zusammengegeben und für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde verfahren wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Die Messung der Luciferase Aktivitäten der beiden Reportergene *Firefly* und *Renilla* wurde nach den Herstellerangaben des Dual-Glo® Luciferase Assay Kits durchgeführt.

3.5 Statistik

Die Ergebnisse dieser Dissertation sind als Mittelwerte mit ihren jeweiligen Standardabweichungen (SD) vom Mittelwert dargestellt. Alle *in vitro* Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Unterschiede zwischen den Mittelwerten zweier Gruppen wurden mit einem gemischten Modell bei der Bestimmung der Apoptoserate oder dem Student's T-Test für die Analyse der Luciferaserate, nach AZA- oder TSA-Behandlung oder siRNA-Knock-down bestimmt (GraphPad Prism 5, SPSS). Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als signifikant angesehen, wenn der p-Wert $< 0,05$ war. Die statistische Evaluation der mRNA-Expression in den verschiedenen Gruppen von astrozytären Gliomen und nicht-neoplastischem Hirngewebe wurde mittels des Kruskal-Wallis-Tests mit Dunn's Korrektur für multiples Testen analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Reduzierte Expression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in *IDH1/2*-mutierten astrozytären Gliomen

Für die Untersuchung, ob die Expression von *miR-16-5p* oder *miR-15a-5p* in Gliomen vom Vorhandensein einer *IDH1* oder *IDH2* Mutation abhängt, wurde die Expression dieser miRNAs in einer Serie von 79 Gliomen mit bereits bekanntem *IDH1/2*-Mutationsstatus (Toedt et al. 2011) untersucht. Die Expression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* war signifikant niedriger in astrozytären Gliomen, die ein mutiertes *IDH1*- oder *IDH2*-Gen aufwiesen als in Gliomen ohne eine solche Mutation (Abbildung 7). Der Befund passt zu den Ergebnissen der eigenen Masterarbeit (Forchmann 2011), dass die Expression von *miR-16-5p* insbesondere in diffusen und anaplastischen Astrozytomen sowie sekundären Glioblastomen, das heißt Tumoren, die mehrheitlich Mutationen in einem der beiden *IDH*-Gene aufweisen, vermindert ist (Weller et al. 2015).

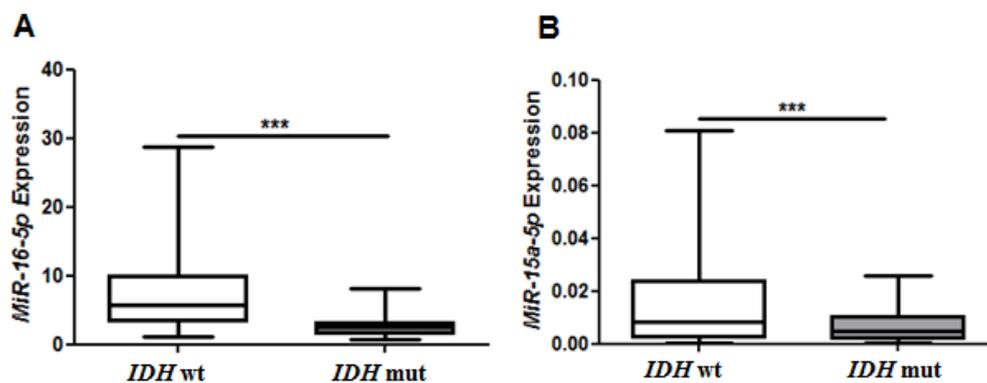


Abbildung 7: Niedrigere Expression von *miR-16-5p* (A) und *miR-15a-5p* (B) in Gliomen, die eine *IDH1*- oder *IDH2*-Mutation haben im Vergleich zu Gliomen, die keine Mutation dieser Gene aufwiesen. Die Expression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* wurde mittels qRT-PCR low density Array in 25 Gliomproben, die eine *IDH1*- oder *IDH2*-Mutation aufweisen und in 54 Gliomproben, die keine *IDH*-Mutationen zeigen, analysiert. Der *IDH1/2*-Mutationsstatus war mittels Sanger-Sequenzierung bestimmt worden (Toedt et al. 2011). Die miRNA-Expression wurde auf vier endogene Kontrollen (*miR-30a-5*, *miR-30b*, *miR-30c* und *miR-30d*) normalisiert. Die dargestellten Box-Plots zeigen die medianen, unteren und oberen Quartile der Expressionswerte in den untersuchten Gruppen und die Fehlerbalken zeigen jeweils den höchsten und des niedrigsten Wert. Um die Gruppen statistisch miteinander zu vergleichen, wurde ein ungepaarter, zweiseitiger Student's T-Test angewandt (***) $p < 0,001$. wt – Wildtyp, mut - mutiert.

4.2 Verminderte Expression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in Gliomzelllinien

Um zu untersuchen, wie *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in Gliomzellen exprimiert werden, wurde in sechs Gliomzelllinien die Expression beider miRNAs im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe mittels qRT-PCR analysiert. Die Expression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* war in A172, T98G, TP365MG, U138MG, U87MG und U251MG signifikant niedriger als in nicht-neoplastischem Hirngewebe (Abbildung 8).

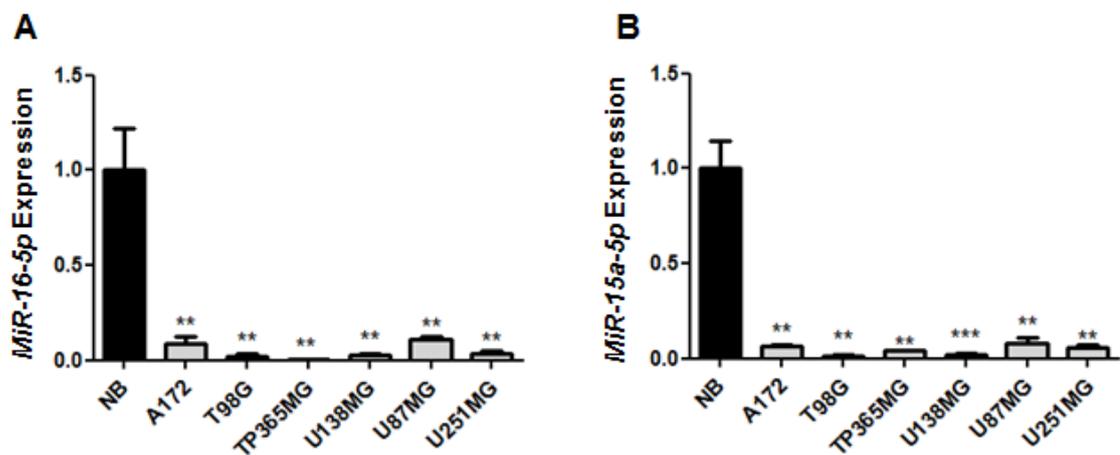


Abbildung 8: Niedrigere Expression von *miR-16-5p* (A) und *miR-15a-5p* (B) in den Gliomzelllinien A172, T98G, TP365MG, U138MG, U87MG und U251MG im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe. Die Expression der *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* wurde mittels qRT-PCR untersucht. Für die Analysen wurden drei verschiedene Passagen von jeder Gliomzelllinie und 11 nicht-neoplastische Hirngewebsproben auf ihre Expression von *miR-16-5p*, *miR-15a-5p* und *U6 snRNA* als Kontrolle hin untersucht. Alle Proben wurden in der qRT-PCR in Duplikaten gemessen. Für die statistische Auswertung wurde der ungepaarte Student's T-Test verwendet, der für multiples Testen korrigiert wurde (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.3 Überexpression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in Gliomzellen nach Transfektion der entsprechenden Vorläufer-miRNAs

In den Gliomzellen A172, T98G, TP365MG, U138MG, U87MG und U251MG waren die Expression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* relativ zu nicht-neoplastischem Hirngewebe stark erniedrigt. Daher wurden für funktionelle Analysen Vorläufer-miRNAs der beiden miRNAs im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen transient überexprimiert. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse quantitativer RT-PCR-Analysen der

Expression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in den sechs Gliomzelllinien nach transienter Transfektion.

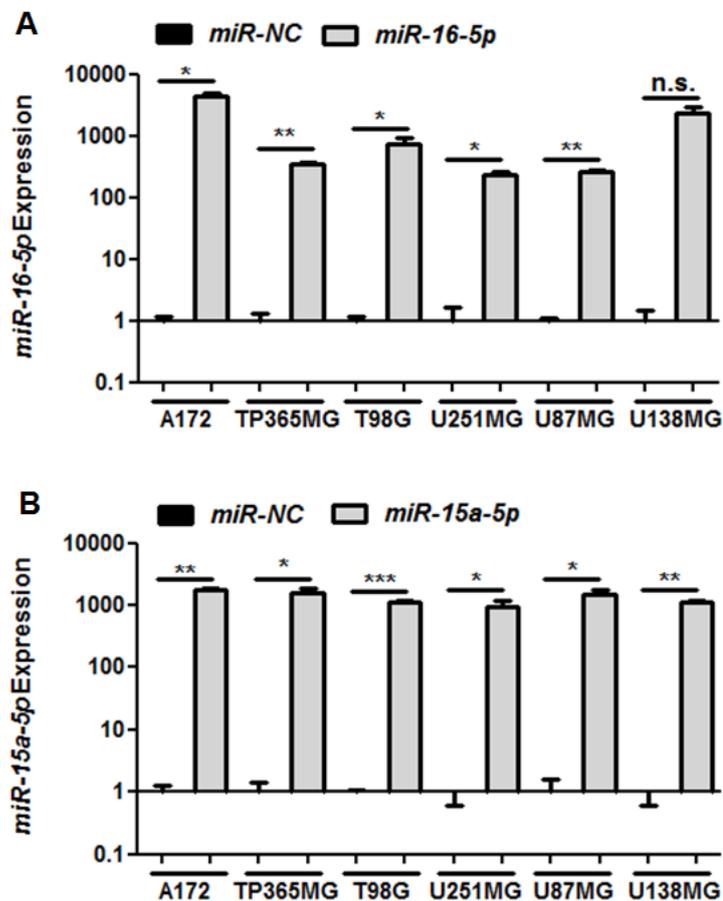


Abbildung 9: In den Gliomzellen A172, TP365MG, T98G, U251MG, U87MG und U138MG, die nur eine geringe Expression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* zeigten, konnte (A) *miR-16-5p* und (B) *miR-15a-5p* überexprimiert werden. Gliomzellen wurden mit 50 nM *miR-16-5p* respektive *miR-15a-5p* Vorläufermolekülen und Kontroll-Vorläufer miRNAs (*miR-NC*) von Ambion für 72 Stunden transfiziert. Anschließend wurde die *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Expression mittels qRT-PCR analysiert. Die Expression von *U6 snRNA* (Exiqon) wurde zur Normalisierung verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte der normalisierten *miR-16-5p* (A) und *miR-15a-5p* (B) Expression aus drei unabhängigen Experimenten. Für die statistische Auswertung wurde der ungepaarte Student's T-Test verwendet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.4 Apoptoseinduktion nach Überexpression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in Gliomzellen

Bereits in den Vorarbeiten zu dieser Dissertationsschrift (Forchmann 2011) wurde der Einfluss einer Überexpression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* auf die Viabilität und Proliferation von Gliomzellen untersucht. Dabei wurde herausgefunden, dass sowohl die Viabilität als auch die Proliferation durch Überexpression von *miR-16-5p* beziehungsweise *miR-15a-5p* in Gliomzellen im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen signifikant gehemmt wird (siehe Kapitel 1.4.2, Abbildung 4 und Abbildung 5).

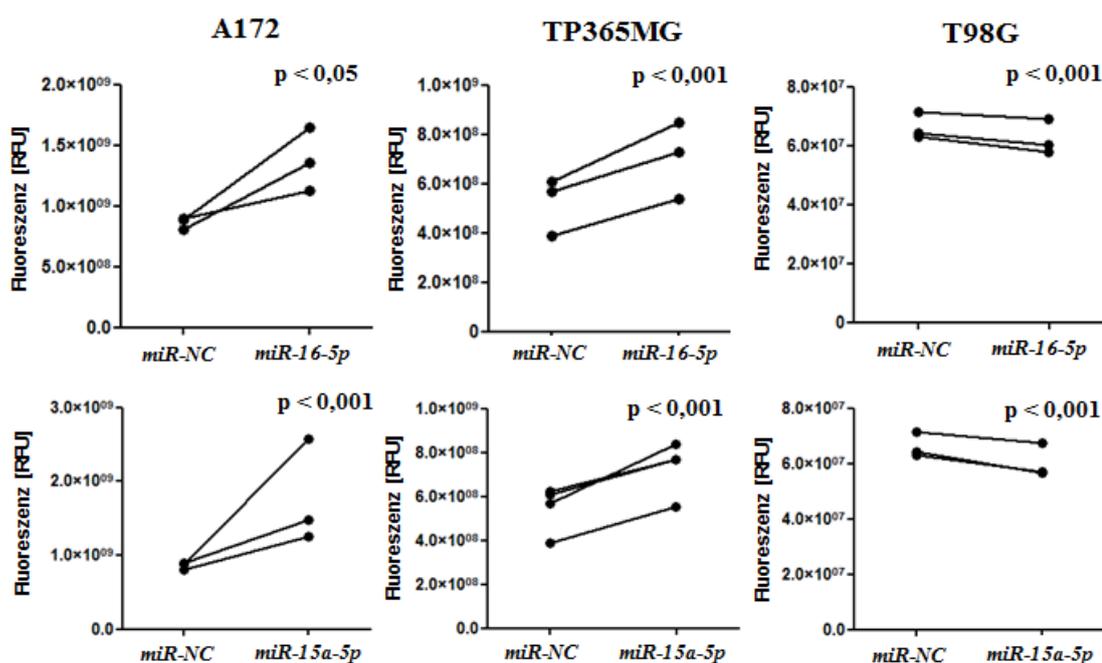


Abbildung 10: Erhöhte Caspase-3/7-Aktivität nach Überexpression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in A172 und TP365MG Gliomzellen im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen. Die Zelllinien A172, TP365MG und T98G wurden transient mit 50 nM *miR-16-5p*, *miR-15a-5p* und *miR-NC* Vorläufermolekülen (Ambion) transfiziert. 72 Stunden nach Transfektion wurde die Caspase-3/7-Aktivität mit dem Apo-ONE homogenous caspase-3/7-assay (Promega) gemessen. Die Punkte in der Grafik repräsentieren jeweils fünf Messungen. Es wurden drei unabhängige Experimente für jede Zelllinie durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde ein gemischtes Modell verwendet, wobei die abhängige Variable die Transfektionsgruppe und die unabhängige Variable die Woche der Transfektion war.

Nach Überexpression von *miR-16-5p* war die Caspase-3/7-Aktivität signifikant um das 1,6-fache in A172 und um das 1,4-fache in TP365MG Zellen erhöht. In A172 Gliomzellen konnte nach *miR-15a-5p* Überexpression ein 2-facher und in TP365MG Zellen einen 1,4-fachen Anstieg der Apoptoserate gefunden werden. In T98G Zellen

wurde nach Überexpression von *miR-16-5p* oder *miR-15a-5p* keine signifikant erhöhte Apoptoseaktivität im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen detektiert (Abbildung 10). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* einen pro-apoptotischen Effekt in zwei von drei untersuchten Gliomzelllinien zeigten.

4.5 Identifizierung von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Bindungsstellen in Zellzyklus- und Apoptose-regulierenden Genen

Um potentielle Zielgene von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* zu identifizieren, wurden die Targetgenvorhersageprogramme Targetscan (<http://www.targetscan.org>, TargetScanHuman 6.2 2014) und miRBase (<http://www.mirbase.org>) verwendet. Mit Hilfe dieser Targetgenvorhersageprogramme wurden zahlreichen Zellzyklus- und Apoptose-regulierende Gene gefunden, die in ihrer 3'-UTR eine oder mehrere Bindestelle(n) für *miR-16-5p* respektive *miR-15a-5p* besitzen. Unter den vorhergesagten Zellzyklus-regulierenden Genen befanden sich sowohl Zellzyklus-inhibierende Gene, wie *WEE1* und *CHEK1*, als auch proliferationsfördernde Gene, wie *CDK6*, *CCND3*, *CCNE1* und *CDC25A*. Des Weiteren wurden *BCL2* und *MCL1* als direkte Targets vorhergesagt, die eine wichtige Rolle in der Apoptoseregulation spielen. Literaturrecherchen zeigten, dass einige der bioinformatisch vorhergesagten Zielgene bereits als direkte Targets von *miR-16-5p* oder *miR-15a-5p* in verschiedenen Geweben experimentell validiert wurden. Zu diesen validierten Zielgenen gehören unter anderem *CDK6* (Liu et al. 2008), *CCND3* (Liu et al. 2008), *CCNE1* (Liu et al. 2008; Bandi et al. 2009; Wang et al. 2009), *CDC25A* (Pothof et al. 2009), *WEE1* (Lezina et al. 2013), *CHEK1* (Lezina et al. 2013) und *BCL2* (Cimmino et al. 2005; Bonci et al. 2008) für die *miR-16-5p*. Für *miR-15a-5p* sind *CCNE1* (Luo et al. 2013) und *BCL2* (Cimmino et al. 2005; Bonci et al. 2008) als direkte Targetgene beschrieben. Um zu untersuchen, ob die vorhergesagten und/oder validierten Targetgene in Gliomen durch *miR-16-5p* respektive *miR-15a-5p* reguliert werden, wurde die Targetgenexpression in *miR-16-5p* beziehungsweise *miR-15a-5p* überexprimierenden Gliomzellen auf mRNA und Proteinebene analysiert.

4.5.1 Verminderte mRNA-Expression von Zielgenen nach Überexpression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in Gliomzellen

In den sechs untersuchten Gliomzelllinien A172, TP365MG, U87MG, T98G, U138MG und U251MG wurde nach *miR-16-5p*-Überexpression eine signifikant verminderte mRNA-Expression von *CDK6*, *CCNE1*, *WEE1* und *CHEK1* gefunden. In fünf Zelllinien wurde *CCND3* durch *miR-16-5p* herunterreguliert und die *CDC25A* Expression war in vier Zelllinien niedriger exprimiert als in Kontroll-transfizierten Zellen. Nach *miR-15a-5p* Überexpression war *CCNE1* in sechs, *CCND3* in fünf, *CDK6* und *WEE1* in vier und *CDC25A* und *CHEK1* in drei der sechs untersuchten Zelllinien relativ zu den Kontroll-transfizierten Zellen signifikant herunterreguliert. Für *BCL2* wurde keine veränderte mRNA-Expression nach Überexpression von *miR-16-5p* oder *miR-15a-5p* beobachtet. Die *MCL1* mRNA-Expression war nach Überexpression von *miR-16-5p* in TP365MG Zellen und nach Überexpression von *miR-15a-5p* in U138MG Zellen herunterreguliert. In den weiteren fünf analysierten Zelllinien wurden keine Expressionsveränderungen dieser Gene auf Transkriptebene detektiert (Abbildung 11, Abbildung 12). Es kann zusammenfassend festgestellt werden, dass *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* die potentiellen direkten Targetgene *CDK6*, *CCND3*, *CCNE1*, *CDC25A*, *WEE1* und *CHEK1* auf mRNA-Ebene regulieren, die eine wichtige Rolle in der Zellzyklusregulation in Gliomen spielen.

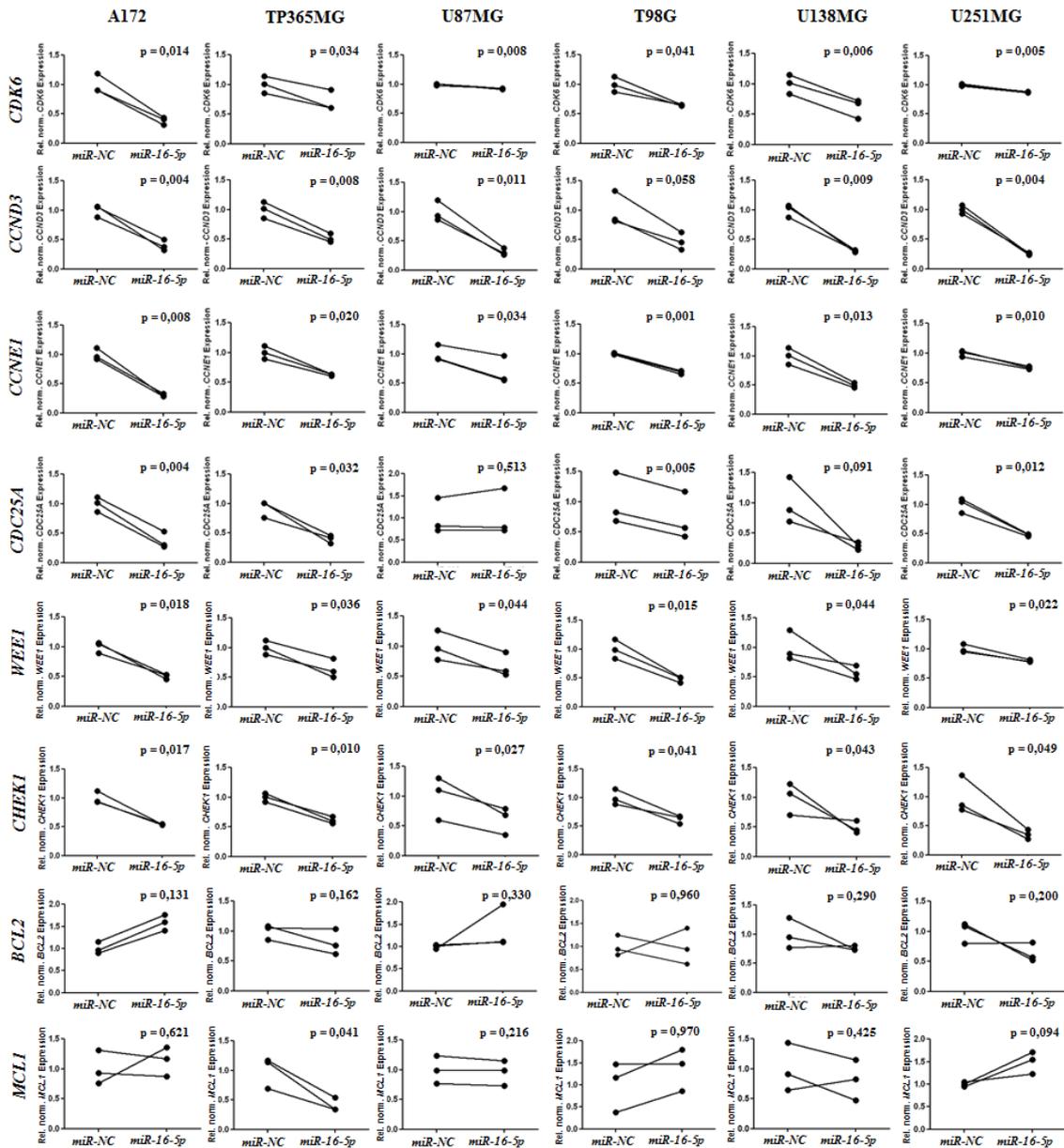


Abbildung 11: Reduzierte mRNA-Expression von Zellzyklus- und/oder Apoptose-regulierenden *miR-16-5p*-Zielgenen nach Überexpression von *miR-16-5p* in Gliomzellen. Dargestellt sind die Ergebnisse von qRT-PCR Expressionsanalysen in Gliomzellen, die transient mit 50 nM *miR-16-5p* und Kontroll-Vorläufer miRNAs (*miR-NC*) von Ambion für 72 Stunden transfiziert wurden. Alle Expressionsdaten wurden auf die Expression von *ARF1* mRNA normalisiert. Die einzelnen Punkte repräsentieren den Mittelwert aus zwei technischen Replikaten. Drei unabhängige Experimente wurden je Zelllinie durchgeführt. Die p-Werte wurden mit dem zweiseitigen, gepaartem Student's T-Test berechnet.

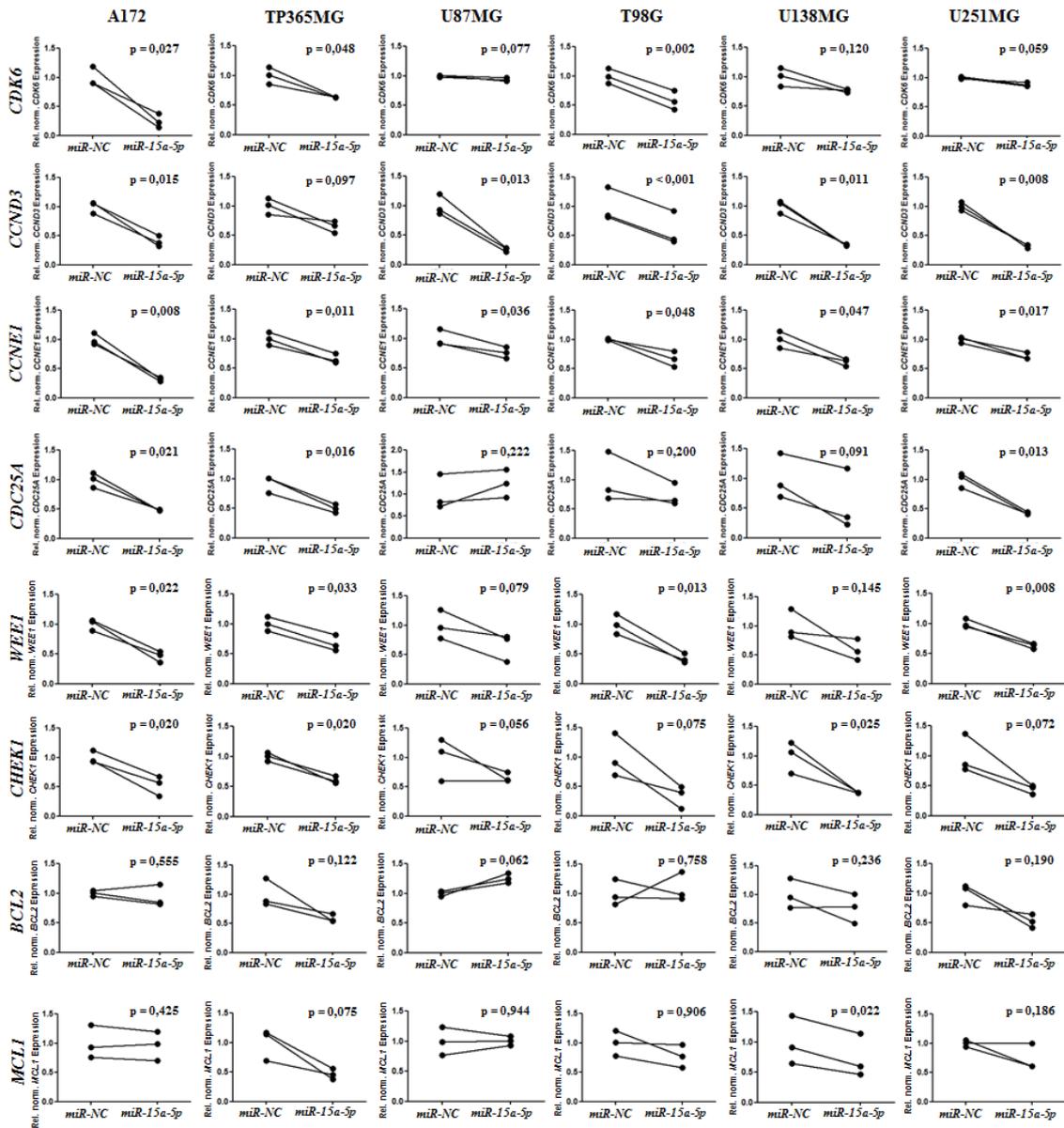


Abbildung 12: Reduzierte mRNA-Expression von Zellzyklus- und/oder Apoptose-regulierenden *miR-15a-5p*-Zielgenen nach Überexpression von *miR-15a-5p* in Gliomzellen. Dargestellt sind die Ergebnisse der qRT-PCR Expressionsanalyse von Gliomzellen, die transient mit 50 nM *miR-15a-5p* und Kontroll-Vorläufer miRNAs (*miR-NC*) von Ambion für 72 Stunden transfiziert wurden. Alle Expressionsdaten wurden auf die Expression von *ARF1* mRNA normalisiert. Die einzelnen Punkte repräsentieren den Mittelwert aus zwei technischen Replikaten. Drei unabhängige Experimente wurden je Zelllinie durchgeführt. Die p-Werte wurden mit dem zweiseitigen, gepaartem Student's T-Test berechnet.

4.5.2 Verminderte Protein-Expression von Zielgenen nach Überexpression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in Gliomzellen

Die Überexpression von *miR-16-5p* in der Gliomzelllinie A172 resultierte in einer mittels Westernblot-Analysen nachweisbaren verminderten Proteinexpression von WEE1, CHK1, CDC25A, Cyclin E1, CDK6, Cyclin D3, MCL1 und BCL2 im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen (

Abbildung 13). In TP365MG Zellen wurde eine verminderte Proteinexpression in *miR-16-5p* überexprimierenden Zellen für WEE1, CHK1, CDC25A, CDK6, Cyclin D3 und MCL1 relativ zu *miR-NC*-transfizierten Zellen festgestellt (Abbildung 14). Nach Überexpression von *miR-16-5p* in U251MG Zellen ließ sich eine verminderte Proteinexpression von CHK1, CDC25A, CDK6 und Cyclin D3 gegenüber Kontroll-transfizierten Zellen nachweisen (Abbildung 15).

Die Überexpression von *miR-15a-5p* in der Gliomzelllinie A172 hatte eine verminderte Proteinexpression von WEE1, CHK1, CDC25A, Cyclin E1, CDK6 und Cyclin D3 gegenüber Kontroll-transfizierten Zellen zur Folge (Abbildung 13). In TP365MG Zellen führte die Überexpression von *miR-15a-5p* zu einer Reduktion der Proteinexpression von CDC25A, CDK6 und Cyclin D3 im Vergleich zu *miR-NC*-transfizierten Zellen (Abbildung 14). Des Weiteren resultierte eine Überexpression von *miR-15a-5p* in U251MG Gliomzellen in einer reduzierten Proteinexpression von WEE1, CDK6, Cyclin D3 und MCL1 relativ zu Kontroll-transfizierten Zellen (Abbildung 15).

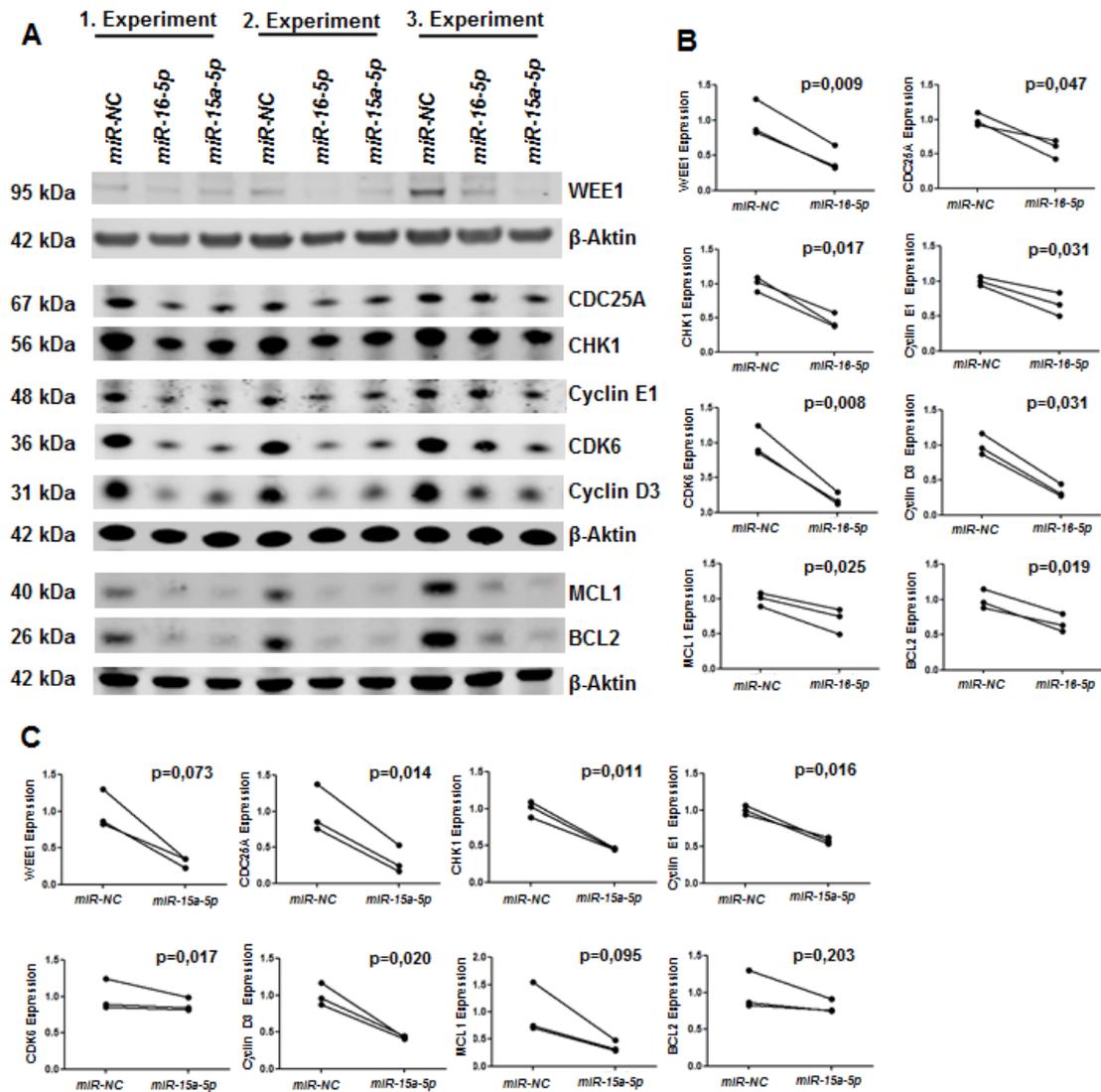


Abbildung 13: Reduzierte Proteinexpression von potentiellen *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Targetgenen nach Überexpression von *miR-16-5p* beziehungsweise *miR-15a-5p* in A172 Gliomzellen. Gezeigt sind die Ergebnisse der Westernblot-Analysen 72 Stunden nach transients Transfektion von 50 nM *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Vorläufermolekülen und Kontroll-Vorläufer miRNAs (*miR-NC*) (Ambion). (A) Es sind die Westernblots von drei biologisch unabhängigen Experimenten gezeigt. (B, C) Graphen der Auswertung der Westernblots dreier unabhängiger Experimente von *miR-16-5p* (B) und von *miR-15a-5p* (C). Die Expressionsdaten wurden auf die Expression von β -Aktin normalisiert. Die p-Werte wurden mit dem zweiseitigen, gepaartem Student's T-Test berechnet.

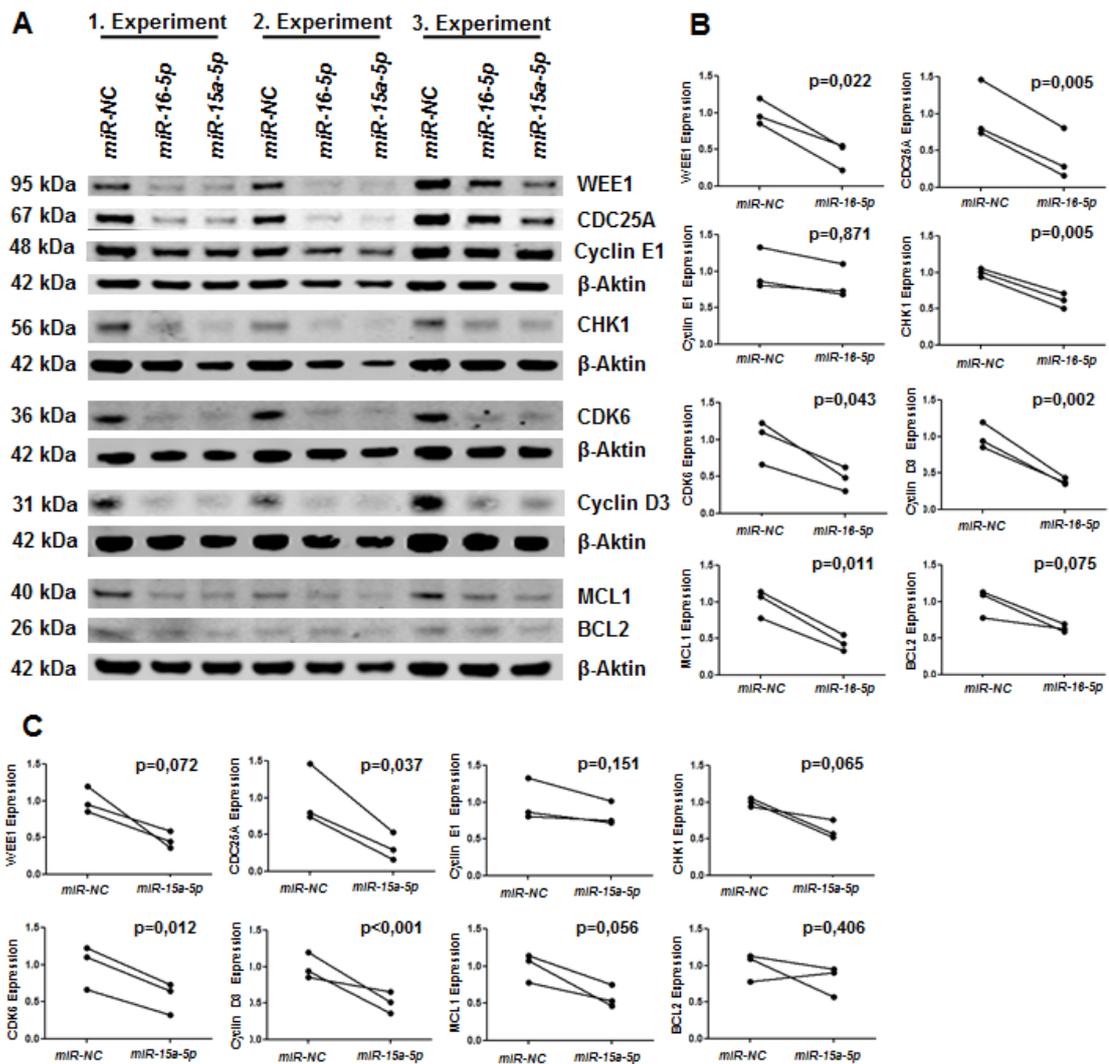


Abbildung 14: Reduzierte Proteinexpression von potentiellen *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Targetgenen nach Überexpression von *miR-16-5p* beziehungsweise *miR-15a-5p* in TP365MG Gliomzellen. Gezeigt sind die Ergebnisse der Westernblot-Analysen 72 Stunden nach transienter Transfektion von 50 nM *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Vorläufermolekülen und Kontroll-Vorläufer miRNAs (*miR-NC*) (Ambion). (A) Es sind die Westernblots von drei biologisch unabhängigen Experimenten gezeigt. (B, C) Graphen der Auswertung der Westernblots dreier unabhängiger Experimente von *miR-16-5p* (B) und von *miR-15a-5p* (C). Die Expressionsdaten wurden auf die Expression von β -Aktin normalisiert. Die p-Werte wurden mit dem zweiseitigen, gepaartem Student's T-Test berechnet.

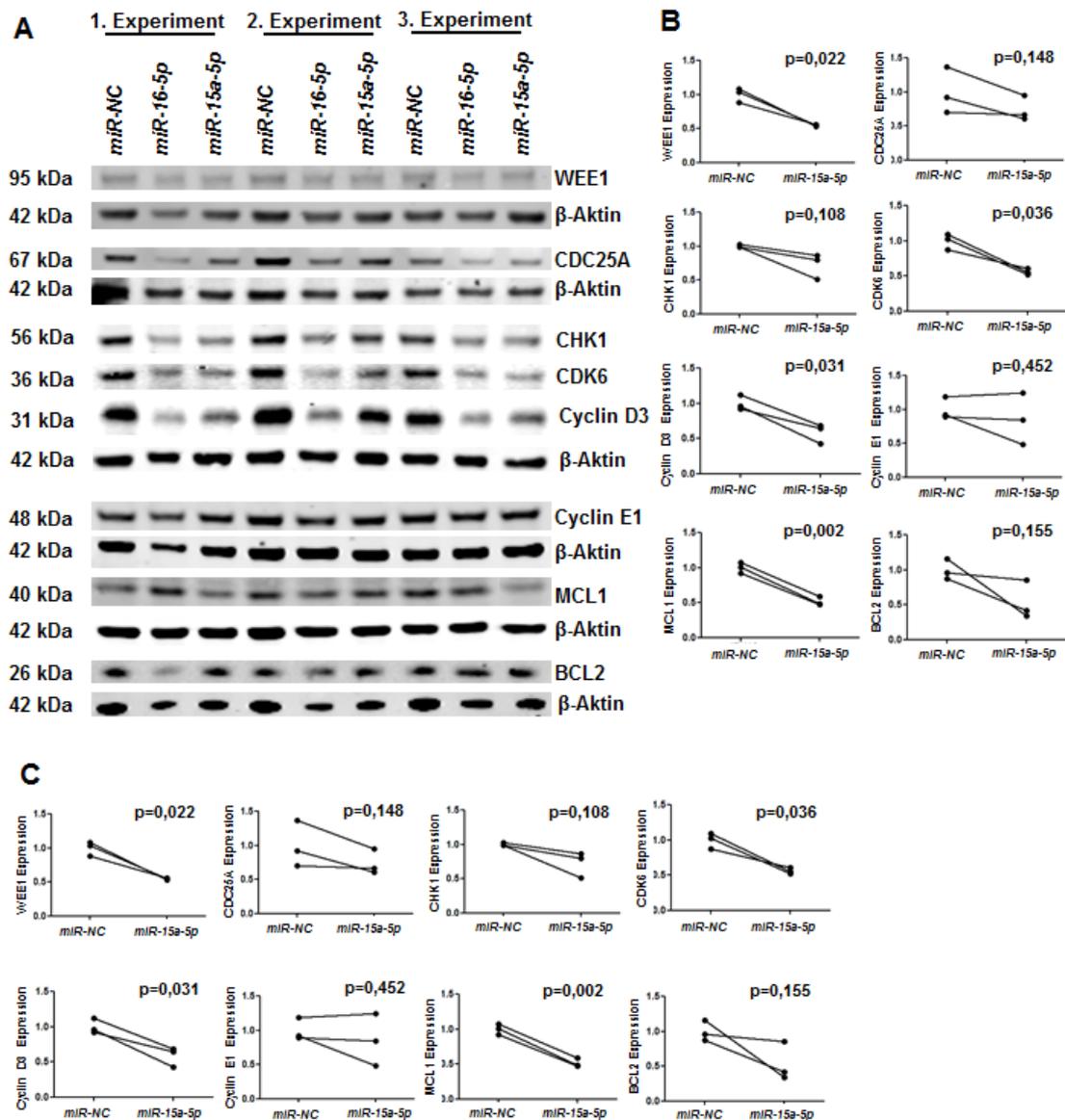


Abbildung 15: Reduzierte Proteinexpression von potentiellen *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Targetgenen nach Überexpression von *miR-16-5p* beziehungsweise *miR-15a-5p* in U251MG Gliomzellen. Gezeigt sind die Ergebnisse der Westernblot-Analysen 72 Stunden nach transienter Transfektion von 50 nM *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Vorläufermolekülen und Kontroll-Vorläufer miRNAs - *miR-NC* - (Ambion). (A) Es sind die Westernblots von drei biologisch unabhängigen Experimenten gezeigt. (B, C) Graphen der Auswertung der Westernblots dreier unabhängiger Experimente von *miR-16-5p* (B) und von *miR-15a-5p* (C). Die Expressionsdaten wurden auf die Expression von β -Aktin normalisiert. Die p-Werte wurden mit dem zweiseitigen, gepaartem Student's T-Test berechnet.

4.5.3 Direkte Bindung von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in der 3'-UTR von *WEE1*, *CHEK1* und *MCL1*

Die 3'-UTRs von *CHEK1*, *WEE1* und *MCL1* haben bioinformatischen Analysen zur Folge potentielle Bindestellen für *miR-16-5p* (Abbildung 16) und *miR-15a-5p* (Abbildung 18).

CHEK1 3' UTR	Position 38-45 <i>CHEK1</i> 3'UTR wt <i>hsa-miR-16-5p</i>	5' ...UCCUGGUGAAUAUAG---UGCUGCUA... 3' GCGGUUAUAAAUGC <u>ACGACGA</u> J
	Position 38-45 <i>CHEK1</i> 3'UTR mut <i>miR-16-5p</i> BS <i>hsa-miR-16-5p</i>	5' ...UCCUGGUGAAUAUAG---GTAGTAGC... 3' GCGGUUAUAAAUGC <u>ACGACGA</u> J
WEE1 3' UTR	Position 265-271 <i>WEE1</i> 3'UTR wt <i>hsa-miR-16-5p</i>	5' ...ACCACUGUGGUGGUGUGCUGCUU... 3' GCGGUUAUAAAUGC <u>ACGACGA</u> J
	Position 265-271 <i>WEE1</i> 3'UTR mut <i>miR-16-5p</i> BS <i>hsa-miR-16-5p</i>	5' ...ACCACUGUGGUGGUGGTAGTAGC... 3' GCGGUUAUAAAUGC <u>ACGACGA</u> J
	Position 544-551 <i>WEE1</i> 3'UTR wt <i>hsa-miR-16-5p</i>	5' ...AUUGCCUUGUGAAUUUGCUGCUA... 3' GCGGUUAUAAAUGC <u>ACGACGA</u> J
	Position 544-551 <i>WEE1</i> 3'UTR mut <i>miR-16-5p</i> BS <i>hsa-miR-16-5p</i>	5' ...AUUGCCUUGUGAAUUGTAGTAGC... 3' GCGGUUAUAAAUGC <u>ACGACGA</u> J
MCL1 3' UTR	Position 2489-2496 <i>MCL1</i> 3'UTR wt <i>hsa-miR-16-5p</i>	5' ...GUCUAAGUGCUGACUGGCUCG... 3' GCGGUUAUAAAUGC <u>ACGAC-GAU</u>
	Position 2489-2496 <i>MCL1</i> 3'UTR wt <i>hsa-miR-16-5p</i>	5' ...GUCUAAGGUAGUAAGGCUCG... 3' GCGGUUAUAAAUGC <u>ACGAC-GAU</u>

Abbildung 16: Schematische Darstellung der 3'-UTR der *WEE1*, *CHEK1* und *MCL1* Reporter-Konstrukte mit den vorhergesagten miRNA-Bindestellen für *miR-16-5p*.

Mittels 3'-UTR-Luciferase-Assays wurde die direkte Bindung von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in der 3'-UTR von *WEE1*, *CHEK1* und *MCL1* nachgewiesen. Die Kotransfektion des psiCHECK2-*WEE1*-wt-Plasmids, welches die 3'-UTR des *WEE1* Gens mit der unmutierten miRNA-Bindungsstelle enthält, mit *miR-16-5p*-Vorläufermolekülen in T98G Gliomzellen reduzierte die Luciferaseaktivität signifikant um circa 50 % im Vergleich zu der entsprechenden Transfektion der Kontroll-miRNA (*miR-NC*). Nach Kotransfektion des psiCHECK2-*WEE1*-Plasmids, welches eine oder beide der potentiellen Bindestellen für *miR-16-5p* in der 3'-UTR des *WEE1* Gens mutiert hatte, und *miR-16-5p*-Vorläufermolekülen war keine Reduktion der

Luciferaseaktivität im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen zu finden (Abbildung 17A). Dies bedeutet, dass die *miR-16-5p* direkt in der 3'-UTR von *WEE1* an beiden Bindestellen bindet.

Kotransfektion von *miR-16-5p*-Vorläufermolekülen und dem psiCHECK2-*CHEK1*-wt-Plasmid in T98G Zellen hatte eine signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität um circa 50 % relativ zu Kontroll-transfizierten Zellen zur Folge. Nach einer parallelen Transfektion von *miR-16-5p*-Vorläufermolekülen und dem psiCHECK2-*CHEK1*-Plasmids, welches die potentielle Bindestelle für *miR-16-5p* in der 3'-UTR des *CHEK1* Gens mutiert hatte, war keine Reduktion der Luciferaseaktivität gegenüber Kontroll-transfizierten Zellen zu beobachten (Abbildung 17B). Dies zeigt, dass *miR-16-5p* direkt in der 3'-UTR von *CHEK1* bindet.

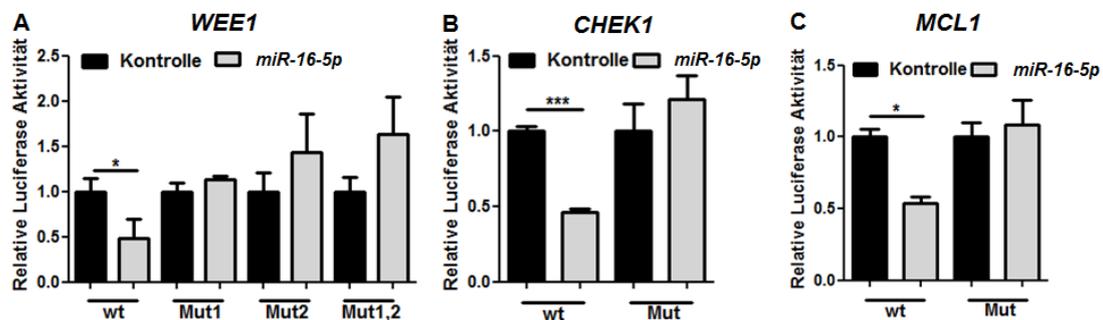


Abbildung 17: *MiR-16-5p* bindet direkt in der 3'-UTR von *WEE1*, *CHEK1* und *MCL1*. (A) Die *WEE1* 3'-UTR wurde mit den zwei vorhergesagten direkten Bindestellen für *miR-16-5p* (wt), mit einer mutierten und einer unmutierten Bindestelle (Mut1, Mut2) oder beiden mutierten *miR-16-5p*-Bindestellen (Mut1,2) downstream des *Renilla*-Gens in den psiCHECK-2-Vektor (Promega) kloniert. (B) Die *CHEK1* 3'-UTRs wurden mit der unmutierten *miR-16-5p*- oder der mutierten *miR-16-5p*-Bindestelle downstream des *Renilla*-Gens in den psiCHECK-2-Vektor kloniert. (C) Die *MCL1* 3'-UTRs wurden mit der unmutierten *miR-16-5p*- oder der mutierten *miR-16-5p*-Bindestelle downstream des *Renilla*-Gens in den psiCHECK-2 Vektor kloniert. (A-C) T98G Gliomzellen wurden mit 100 ng der *WEE1*, *CHEK1* oder *MCL1* 3'-UTR Reporter-Konstrukt-DNA und 50 nM *miR-16-5p* respektive *miR-NC* (Kontrolle) Vorläufermolekülen für 72 Stunden (*WEE1*) beziehungsweise 48 Stunden (*CHEK1* und *MCL1*) kotransfiziert. Balken und Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Jedes Experiment bestand aus fünf technischen Replikaten. Sterne zeigen die signifikante Luciferase-Aktivitätsänderung an, die mittels des zweiseitigen, gepaarten Student's T-Tests berechnet wurde (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Kotransfektion des psiCHECK2-*MCL1*-wt-Plasmids, welches eine 3'-UTR des *MCL1*-Gens mit unmutierter *miR-16-5p*-Bindestelle enthielt, mit *miR-16-5p*-Vorläufermolekülen in T98G Gliomzellen reduzierte die Luciferaseaktivität signifikant um circa 50 % im Vergleich zu der entsprechenden Transfektion der Kontroll-miRNA (*miR-NC*). Nach Kotransfektion des psiCHECK2-*MCL1*-Plasmids, welches die

potentielle Bindestelle der *miR-16-5p* in der 3'-UTR des *MCL1* Gens mutiert hatte, und *miR-16-5p*-Vorläufermolekülen war keine Reduktion der Luciferaseaktivität im Vergleich zu den Kontroll-transfizierten Zellen zu finden (Abbildung 17C). Dies bedeutet, dass *miR-16-5p* direkt in der 3'-UTR von *MCL1* bindet.

CHEK1 3'UTR	Position 38-45 CHEK1 3'UTR wt <i>hsa-miR-15a-5p</i>	5' ...UCCUGGUGAAUAUAG---UGCUGCUA... 	3' GUGUUUGGUAUAUACGACGAU
	Position 38-45 CHEK1 3'UTR mut <i>miR-15a-5p</i> BS <i>hsa-miR-15a-5p</i>	5' ...UCCUGGUGAAUAUAG---GTAGTAGC...	3' GUGUUUGGUAUAUACGACGAU
WEE1 3'UTR	Position 265-271 WEE1 3'UTR wt <i>hsa-miR-15a-5p</i>	5' ...ACCACUGUGGGUGUGUCGCUU... 	3' GUGUUUGGUAUAUACGACGAU
	Position 265-271 WEE1 3'UTR mut <i>miR-16-5p</i> BS <i>hsa-miR-15a-5p</i>	5' ...ACCACUGUGGGUGGTTAGTAGC...	3' GUGUUUGGUAUAUACGACGAU
	Position 544-551 WEE1 3'UTR wt <i>hsa-miR-15a-5p</i>	5' ...AUUGCCUUGUGAAUUGUCGCUA... 	3' GUGUUUGGUAUAUACGACGAU
	Position 544-551 WEE1 3'UTR mut <i>miR-16-5p</i> BS <i>hsa-miR-15a-5p</i>	5' ...AUUGCCUUGUGAAUUGTTAGTAGC...	3' GUGUUUGGUAUAUACGACGAU
MCL1 3'UTR	Position 2489-2496 MCL1 3'UTR wt <i>hsa-miR-15a-5p</i>	5' ...GUCUAAGUGCUGACUGGCUCG... 	3' GUGUUUGGUAUAUACGAC-GAU
	Position 2489-2496 MCL1 3'UTR wt <i>hsa-miR-15a-5p</i>	5' ...GUCUAAGGUAGUAAGGCUCG...	3' GUGUUUGGUAUAUACGAC-GAU

Abbildung 18: Schematische Darstellung der 3'-UTR der *WEE1*, *CHEK1* und *MCL1* Reporter-Konstrukte mit den vorhergesagten miRNA-Bindestellen.

Nach Kotransfektion von *miR-15a-5p*-Vorläufermolekülen und dem psiCHECK2-*WEE1*-wt-Plasmid in T98G Gliomzellen war die Luciferaseaktivität signifikant um circa 50 % im Vergleich zur Kotransfektionen der Kontroll-miRNA mit dem psiCHECK2-*WEE1*-wt-Plasmid reduziert. Nach Transfektion von *miR-15a-5p*-Vorläufermolekülen und dem psiCHECK2-*WEE1*-Plasmid, welches eine oder beide der potentiellen Bindestellen der *miR-15a-5p* in der 3'-UTR des *WEE1* Gens mutiert hatte, war die Luciferaseaktivität relativ zu Kontroll-transfizierten Zellen nicht vermindert (Abbildung 19A). Dieses Ergebnis zeigt, dass *miR-15a-5p* direkt in der 3'-UTR von *WEE1* an beiden potentiellen Bindestellen bindet.

Nach der Kotransfektion von *miR-15a-5p*-Vorläufermolekülen und dem psiCHECK2-*CHEK1*-wt-Plasmid in T98G Zellen war eine signifikant reduzierte Luciferaseaktivität um 55 % relativ zu Kontroll-transfizierten Zellen zu finden. Nach einer Transfektion von *miR-15a-5p*-Vorläufermolekülen und dem psiCHECK2-*CHEK1*-Plasmid, welches die potentielle Bindestelle für *miR-15a-5p* in der 3'-UTR des *CHEK1* Gens mutiert hatte, war keine Reduktion der Luciferaseaktivität zu beobachten (Abbildung 19B). Somit bindet *miR-15a-5p* direkt in der 3'-UTR von *CHEK1*.

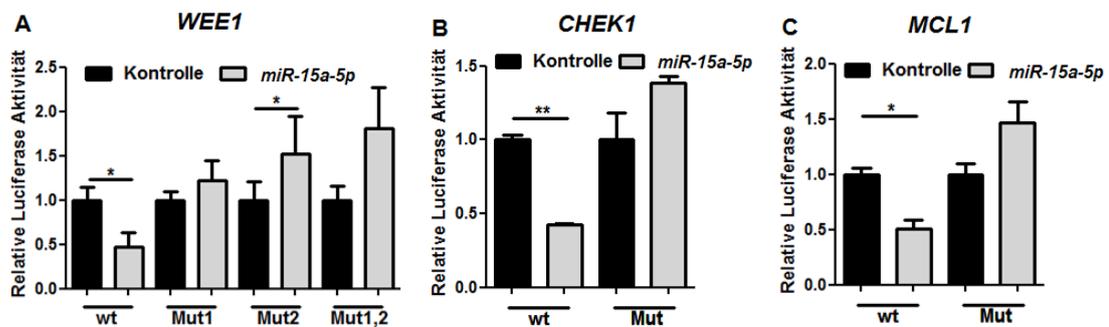


Abbildung 19: *MiR-15a-5p* bindet direkt in der 3'-UTR von *WEE1*, *CHEK1* und *MCL1*. (A) Die *WEE1* 3'-UTR wurde mit den zwei vorhergesagten direkten Bindestellen für *miR-15a-5p* (wt), mit einer mutierten und einer unmutierten Bindestelle (Mut1, Mut2) oder beiden mutierten *miR-15a-5p*-Bindestellen (Mut1,2) downstream des *Renilla*-Gens in den psiCHECK-2-Vektor (Promega) kloniert. (B) Die *CHEK1* 3'-UTRs wurden mit der unmutierten *miR-15a-5p*- oder der mutierten *miR-15a-5p*-Bindestelle downstream des *Renilla*-Gens in den psiCHECK-2-Vektor kloniert. (C) Die *MCL1* 3'-UTRs wurden mit der unmutierten *miR-15a-5p*- oder der mutierten *miR-15a-5p*-Bindestelle downstream des *Renilla*-Gens in den psiCHECK-2 Vektor kloniert. (A-C) T98G Gliomzellen wurden mit 100 ng der *WEE1*, *CHEK1* oder *MCL1* 3'-UTR Reporter-Konstrukt-DNA und 50 nM *miR-15a-5p* respektive *miR-NC* (Kontrolle) Vorläufermolekülen für 72 Stunden (*WEE1*) beziehungsweise 48 Stunden (*CHEK1* und *MCL1*) kotransfiziert. Balken und Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Jedes Experiment bestand aus fünf technischen Replikaten. Sterne zeigen die signifikante Luciferase-Aktivitätsänderung an, die mittels des zweiseitigen, gepaarten Student's T-Tests berechnet wurde (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Kotransfektion des psiCHECK2-*MCL1*-wt-Plasmids, welches eine reguläre 3'-UTR des *MCL1* Gens hat, mit *miR-15a-5p*-Vorläufermolekülen in T98G Gliomzellen reduzierte die Luciferaseaktivität signifikant um circa 50 % im Vergleich zu der entsprechenden Transfektion der Kontroll-miRNA (*miR-NC*). Nach Kotransfektion des psiCHECK2-*MCL1*-Plasmids, welches die potentielle Bindestelle der *miR-15a-5p* in der 3'-UTR des *MCL1*-Gens mutiert hatte, und *miR-15a-5p*-Vorläufermolekülen war keine Reduktion der Luciferaseaktivität im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen zu finden (Abbildung 19C). Dies bedeutet, dass *miR-15a-5p* direkt in der 3'-UTR von *MCL1* bindet.

4.5.4 Erhöhte mRNA-Expression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Targetgenen in astrozytären Gliomen

Um die mRNA-Expression der direkten *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Targetgene in Gliomen zu bestimmen, wurden Mikroarray-basierte Expressionsdaten einer früheren Studie (Toedt et al. 2011) von 70 Gliomen, darunter 8 diffuse Astrozytome (A II), 12 anaplastische Astrozytome (AA III), 9 sekundäre Glioblastome (sGBIV), 41 primäre Glioblastome (pGBIV), und 4 nicht-neoplastische Hirngewebe (NB) in Kooperation mit Herrn Dr. B. Radlwimmer (DKFZ, Heidelberg) analysiert. Die Mikroarray-basierten Expressionsdaten zeigten, dass die mRNA-Expression von *CDK6*, *WEE1*, *CHEK1* und *MCL1* in Gliomen im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe signifikant hochreguliert waren (Abbildung 20).

Die *CDK6* mRNA-Expression war signifikant in sGBIV (2,6-fach) und pGBIV (2,4-fach) im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe erhöht. In den Gruppen der AII und AAIII war keine vermehrte *CDK6* mRNA-Expression zu finden. *CCND3*, *CCNE1* und *CDC25A* zeigten in den untersuchten Gliomproben auf mRNA-Ebene keine signifikant veränderte Expression gegenüber nicht-neoplastischem Hirngewebe. Die Expression von *CDC25A* war in AAIII 0,3-fach, sGBIV 0,6-fach und pGBIV 0,8-fach leicht erhöht, was als eine Tendenz einer vermehrten *CDC25A* mRNA-Expression relativ zu nicht-neoplastischem Hirngewebe gedeutet werden kann. Die *WEE1* mRNA-Expression war in AAIII 2,6-fach, sGBIV 3,4-fach und pGBIV 3,7-fach im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe erhöht. In der Gruppe der AII Gliome konnte keine signifikant höhere *WEE1* Expression gefunden werden. *CHEK1* mRNA-Expression war in AAIII 1,2-fach, sGBIV 2,0-fach und pGBIV 1,5-fach im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe erhöht. Für *BCL2* wurden keine Expressionsunterschiede zwischen Gliomen und nicht-neoplastischem Hirngewebe gefunden. Die mRNA-Expression von *MCL1* war in AA III 2-fach und pGBIV 2,2-fach gegenüber nicht-neoplastischem Hirngewebe erhöht.

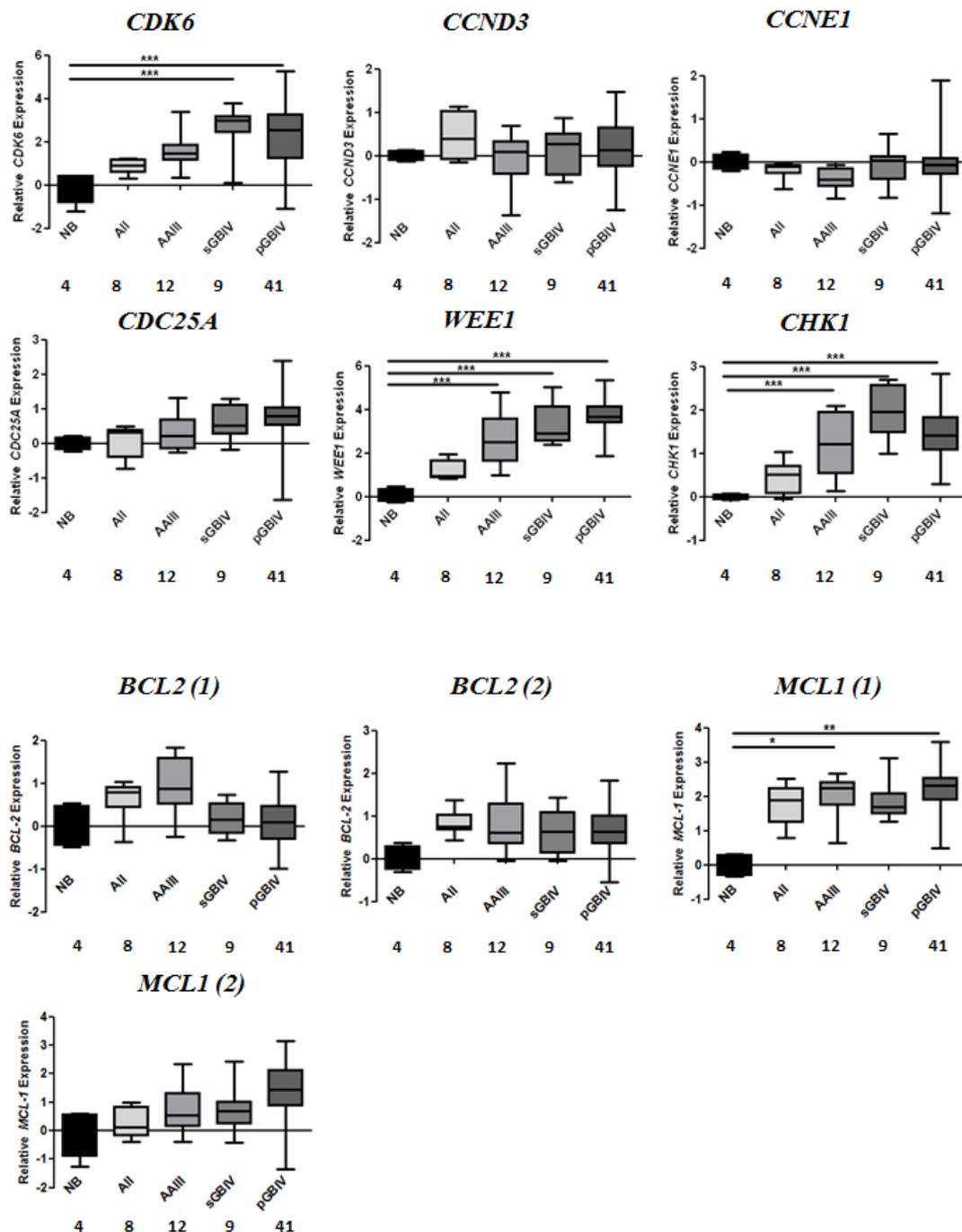


Abbildung 20: Expressionsanalysen von direkten *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Zielgenen in astrozytären Gliomen im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe. Gezeigt sind die Ergebnisse einer Mikroarray-basierten Expressions-Analyse von humanen Gliomproben. Die dargestellten Box-Plots zeigen die medianen, unteren und oberen Quartile der normalisierten Expressionswerte in den untersuchten Gruppen und die Fehlerbalken bilden den jeweils höchsten und den niedrigsten Wert ab. Um die Gruppen statistisch miteinander zu vergleichen, wurde der Kruskal-Wallis Test durchgeführt, der für multiples Testen korrigiert wurde. Signifikante Unterschiede wurden durch Sterne markiert (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001). NB: Nicht-neoplastisches Hirngewebe, AI: diffuses Astrozytom, AAI: anaplastisches Astrozytom, sGBIV: sekundäres Glioblastom und pGBIV: primäres Glioblastom. Die Zahl unter den Box-Plots gibt die Anzahl der untersuchten nicht-neoplastischen Hirngewebs- und Gliomproben an.

4.6 Regulation der Expression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in Gliomen

In meiner Studie habe ich herausgefunden, dass die *miR-16-5p* in Gliomen und *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in Gliomzelllinien herunterreguliert waren. MiRNAs werden über verschiedene Mechanismen reguliert. So wurde beschrieben, dass miRNAs in Tumoren durch Deletion eines Chromosomenstückes, Regulationen von Transkriptionsfaktoren oder auf epigenetischem Weg herunterreguliert sind. Deletionsstudien in Gliomen ergaben, dass die Chromosomenregion 13q14.3 nicht durch Verluste gekennzeichnet war. Da bekannt ist, dass in vielen Tumoren, einschließlich Gliomen, die epigenetische Regulation eine wichtige Rolle spielt, wurden Gliomzelllinien mit 5-Aza-2'-Deoxyzytidin (AZA) und Trichostatin A (TSA) behandelt um zu untersuchen, ob DNA-Methylierung und/oder Histonmodifikationen eine Rolle bei der Regulation der *miR-16-5p* in Gliomen spielen.

4.6.1 DNA-Demethylierung zeigt keinen Einfluss auf die *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Expression in Gliomzellen

Die Gliomzelllinien A172, TP365MG und T98G wurden mit AZA in verschiedenen Konzentrationen für 72 Stunden behandelt. Nach der AZA Behandlung wurden keine signifikanten Expressionsveränderungen der *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* im Vergleich zu Kontroll-behandelten Zellen gefunden (Abbildung 21). Auch die Expression von *DLEU2*, dem Wirtsgen der miRNAs *miR-16-5p* und *miR-15a-5p*, zeigte keine Veränderungen nach AZA Behandlung im Vergleich zu Kontroll-behandelten Zellen. Dies deutet darauf hin, dass DNA-Methylierung in Gliomzellen keine wesentliche Rolle bei der Regulation der *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* zu spielen scheint.

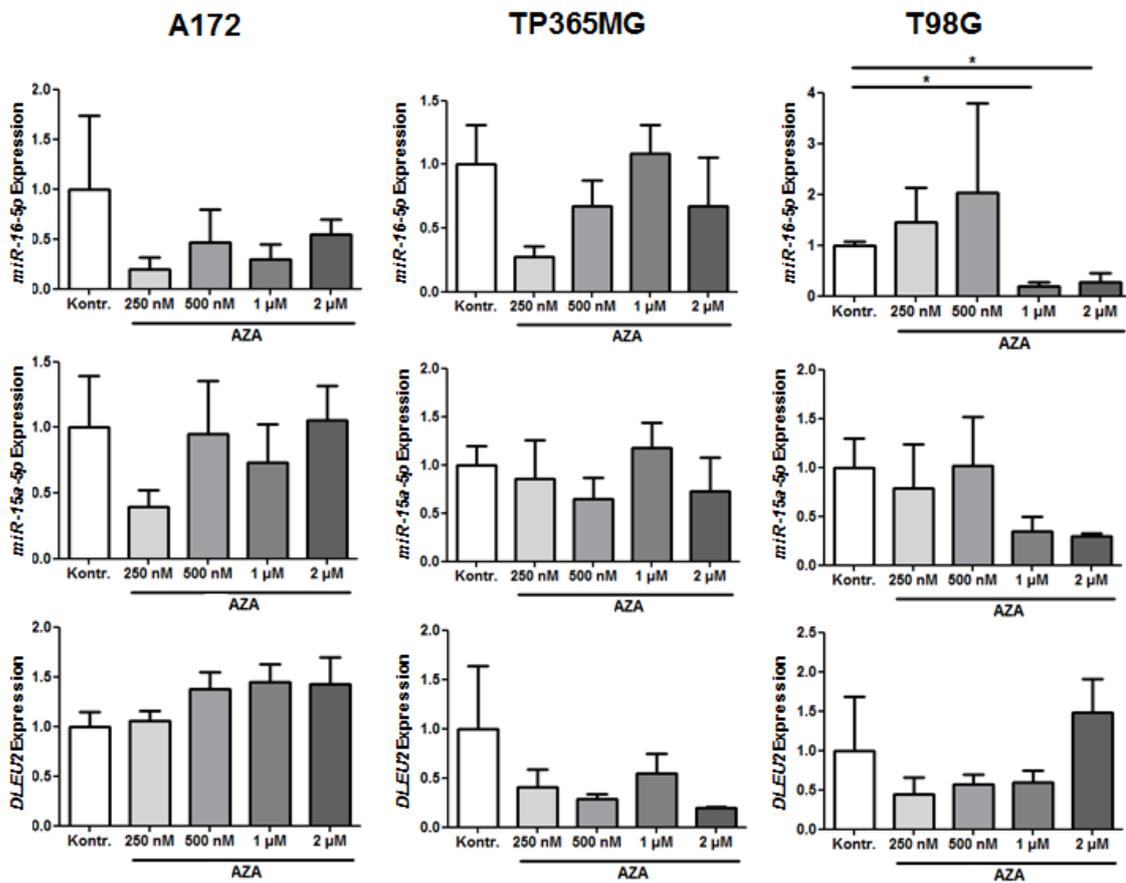


Abbildung 21: Die Behandlung von Gliomzellen mit AZA, wodurch die DNA hypomethyliert wird, hat keine signifikanten Expressionsänderung von *miR-16-5p*, *miR-15a-5p* und deren Wirtsgen *DLEU2* zur Folge. Gezeigt ist die Expression von *miR-16-5p*, *miR-15a-5p* und *DLEU2* nach AZA Behandlung und in den entsprechenden Kontrollen in A172, TP365MG und T98G Gliomzellen. Die Gliomzellen wurden mit 250 nM, 500 nM, 1 µM und 2 µM AZA für 72 Stunden behandelt. Die Expression der *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* wurde mittels qRT-PCR untersucht. Für die Expressionsanalyse von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* wurde das *first-strand cDNA synthesis* Kit und *LNATM PCR primer sets* spezifisch für *miR-16-5p*, *miR-15a-5p* und *U6 snRNA* - als endogene Kontrolle - von Exiqon verwendet. Mittels qRT-PCR wurde die *DLEU2* Expression identifiziert. Die Daten wurden auf *ARF1* normalisiert. Drei unabhängige Experimente wurden je Zelllinie durchgeführt. Von jedem Replikat wurden in der qRT-PCR jeweils Duplikate analysiert. Die p-Werte wurden mit dem zweiseitigen, gepaarten Student's T-Test berechnet (* $p < 0,05$). Kontr. = Kontrolle.

4.6.2 Überexpression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* nach Histondeazetylase-Hemmung in Gliomzellen

4.6.2.1 Überexpression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* nach TSA Behandlung von Gliomzellen

Es wurde beschrieben, dass Histonmodifikationen eine wichtige Rolle in der Regulation von *miR-16-5p* in lymphatischen Tumoren spielen. Somit untersuchte ich Glioblastomzelllinien, die mit dem Histondeazetylase Inhibitor TSA behandelt wurden, ob sich die *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Expression ändert (Abbildung 22). In den Gliomzelllinien A172, TP365MG und U138MG, die mit TSA behandelt wurden, zeigten qRT-PCR Analysen, dass die *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Expression signifikant erhöht war. In T98G Zellen konnte keine signifikante Änderung der *miR-16-5p* oder *miR-15a-5p* festgestellt werden. Zusätzlich zeigte das Wirtsgen der *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* *DLEU2* eine signifikant erhöhte Expression in T98G und U138MG Zellen gegenüber Kontroll-behandelten Zellen, die nicht mit TSA behandelt wurden. Die *p21* Expression wurde als Positivkontrolle für die TSA Behandlung verwendet, da von diesem Gen bekannt ist, dass es durch Histonmodifikationen reguliert wird. In allen vier untersuchten Gliomzelllinien wurde eine signifikant erhöhte Expression der *p21* Expression in den TSA behandelten Zellen gegenüber den Kontrollzellen beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen, dass Histonmodifikationen eine Rolle in der Regulation der miRNAs *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in Gliomen spielen.

4.6.2.2 Verminderte Expression von *CDK6*, *CDC25A*, *WEE1* und *CHEK1* nach TSA Behandlung von Gliomzellen

Des Weiteren wurde die Expression der Targetgene der *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* *CDK6*, *CCND3*, *CCNE1*, *CDC25A*, *WEE1*, *CHEK1*, *BCL2* und *MCL1* in Gliomzellen untersucht, die mit TSA behandelt wurden. Die Targetgene der *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* *WEE1* und *CHEK1* zeigten in allen vier getesteten Zelllinien, *CDC25A* und *CDK6* in drei beziehungsweise zwei von vier untersuchten Zelllinien, eine verminderte Expression in den TSA behandelten Zellen im Vergleich zu Kontroll-behandelten Zellen (Abbildung 23). Für die Targetgene *CCND3*, *BCL2* und *MCL1* konnte nur in einer Zelllinie nach TSA Behandlung vergleichend mit Kontroll-behandelten Zellen

eine verminderte Expression beobachtet werden. Die *CCNE1* Expression war nach TSA Behandlung gegenüber den Kontrollen nicht verändert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die TSA Behandlung die Expression von *WEE1*, *CHEK1*, *CDK6* und *CDC25A* in Gliomzellen moduliert.

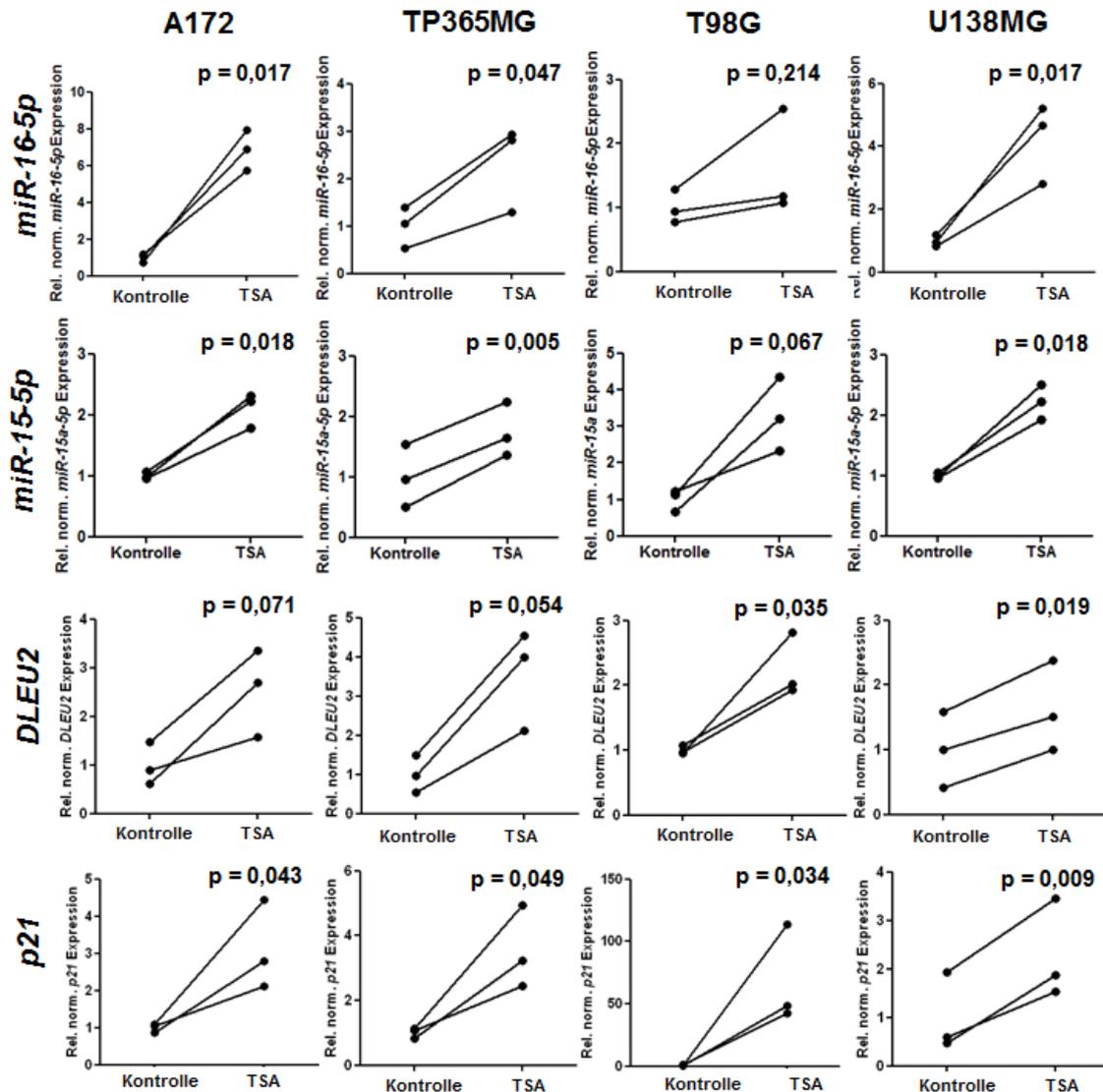
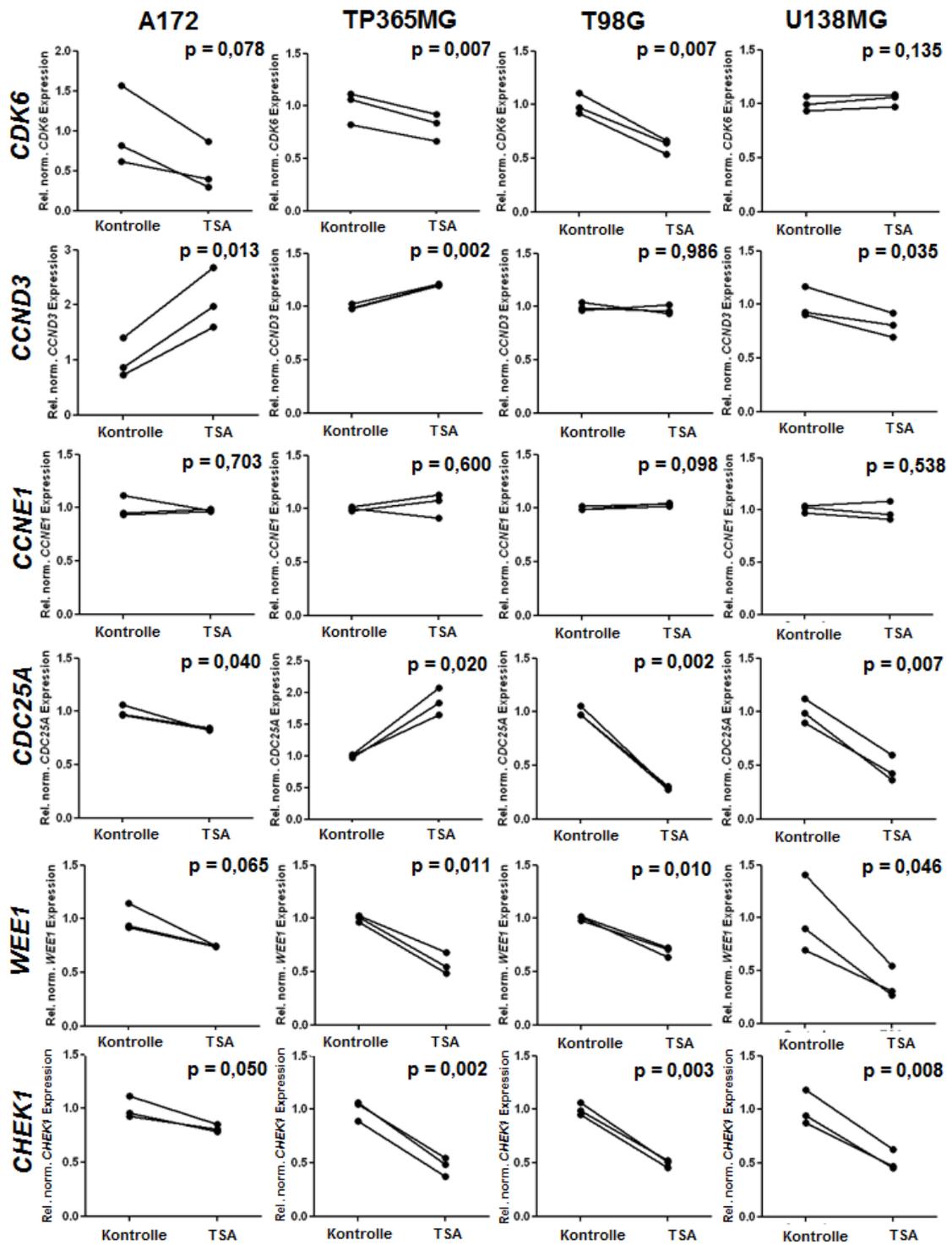


Abbildung 22: Die TSA Behandlung, wodurch die Histondeazetylasen gehemmt werden, führte zur Reexpression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* und des Wirtsgen *DLEU2*. Gezeigt ist die Expression von *miR-16-5p*, *miR-15a-5p*, *DLEU2* und *p21* nach TSA Behandlung in A172, TP365MG, T98G und U138MG Gliomzellen. Die Gliomzellen wurden mit 1 μ M TSA für 36 Stunden behandelt. Die Expression der *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* wurde mittels qRT-PCR untersucht. Für die Expressionsanalyse von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* wurde das *first-strand cDNA synthesis* Kit und *LNATM PCR primer sets* spezifisch für *miR-16-5p*, *miR-15a-5p* und *U6 snRNA* - als endogene Kontrolle - von Exiqon verwendet. Mittels qRT-PCR wurde die Genexpression von *DLEU2* und dem Kontrollgen *p21* untersucht um die Effizienz der Behandlung zu testen. Die Daten von *p21* und *DLEU2* wurden auf *ARF1* normalisiert. Die Punkte repräsentieren je zwei technische Replikate. Drei unabhängige Experimente wurden je Zelllinie durchgeführt. Die p-Werte wurden mit dem zweiseitigen, gepaartem Student's T-Test berechnet.



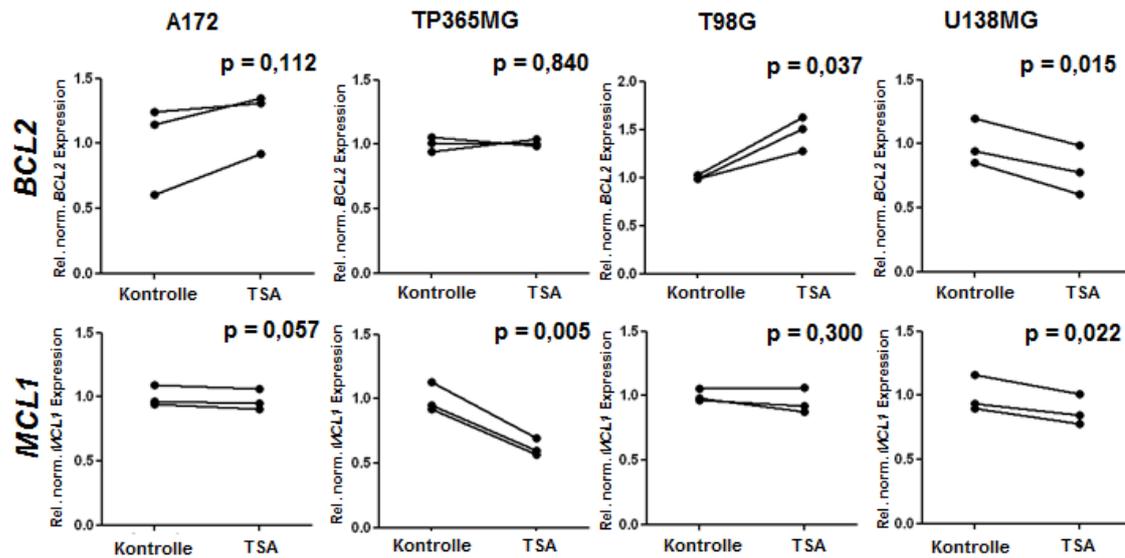


Abbildung 23: Die TSA Behandlung, wodurch die Histondeazetylasen gehemmt werden, führt zur Inhibierung zahlreicher direkter Targetgene der *miR-16-5p* und *miR-15a-5p*, die mittels qRT-PCR Analysen bestimmt wurden. Gezeigt ist die Expression von *CDK6*, *CCND3*, *CCNE1*, *CDC25A*, *WEE1*, *CHEK1*, *BCL2* und *MCL1* nach TSA Behandlung und in den entsprechenden Kontrollen in A172, TP365MG, T98G und U138MG Gliomzellen. Die Zellen wurden mit 1 μ M TSA für 36 Stunden behandelt. Mittels qRT-PCR wurde die Genexpression von *CDK6*, *CCND3*, *CCNE1*, *CDC25A*, *WEE1*, *CHEK1*, *BCL2* und *MCL1* ermittelt. Die Daten wurden auf *ARF1* normalisiert. Die Punkte repräsentieren je zwei technische Replikate. Drei unabhängige Experimente wurden je Zelllinie durchgeführt. Die p-Werte wurden mit dem zweiseitigen, gepaartem Student's T-Test berechnet.

4.6.3 Die Expression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* wird durch den Knock-down von MYC induziert

Es wurde in verschiedenen Studien herausgefunden, dass MYC in der Promotorregion von *DLEU2*, dem Wirtsgen von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p*, bindet und die miRNA-Expression negativ reguliert (Chang et al. 2008). Deswegen analysierte ich in Gliomzellen die *miR-16-5p*, *miR-15a-5p* und *DLEU2* Expression nach einem MYC Knock-down.

Als erstes wurde die Effizienz des siRNA vermittelten Knock-downs von MYC auf Protein- und mRNA-Ebene getestet. In T98G (Abbildung 24 A) und U87MG Zellen (Abbildung 24 D) war die MYC Expression nach dem MYC Knock-down auf Proteinebene vermindert. Die MYC mRNA-Expression war nach dem siRNA Knock-down von MYC um circa 80 % reduziert im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen (Abbildung 24 B und E).

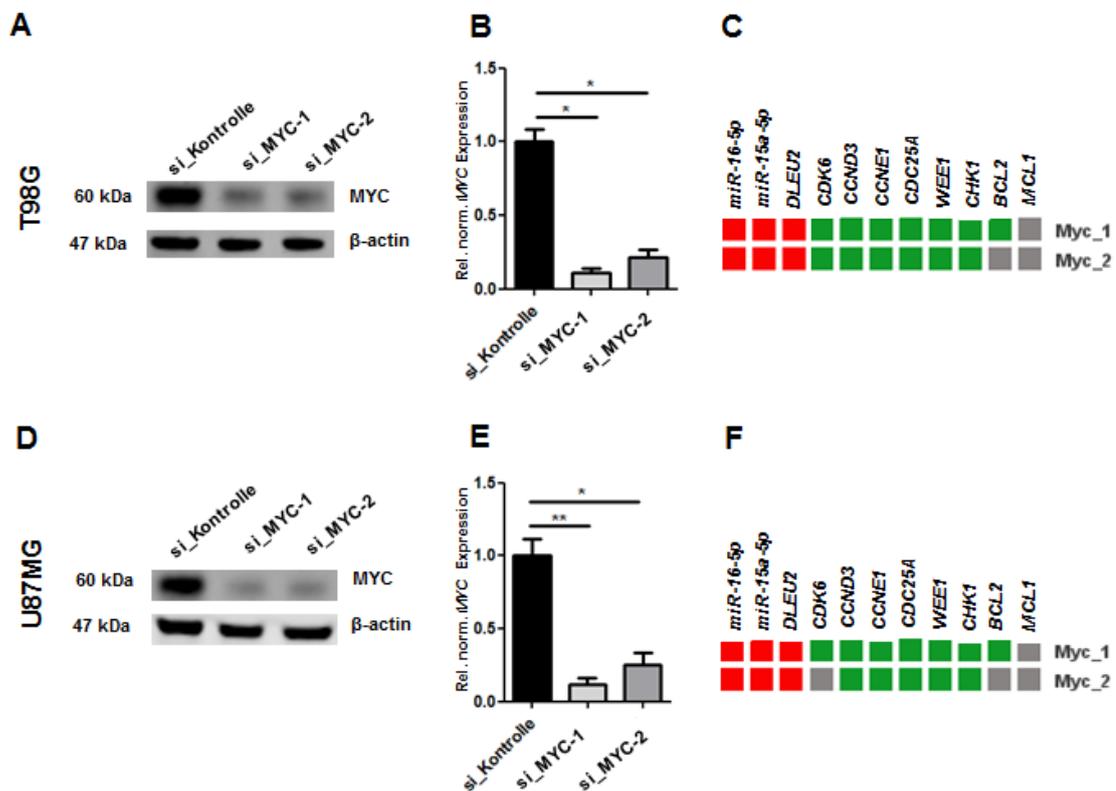


Abbildung 24: MYC Knock-down mittels siRNAs induziert signifikant die Expression von *miR-16-5p*, *miR-15a-5p* und deren Wirtsgen *DLEU2* und hemmt die Expression der direkten Targetgene der *miR-16-5p* und *miR-15a-5p*. Dargestellt sind die Ergebnisse nach MYC Knock-down auf mRNA- und Proteinebene in T98G und U87MG Gliomzellen. Die Zellen wurden mit 50 nM zweier verschiedener siRNA Moleküle gegen MYC (Quiagen) und Kontroll-siRNAs (*AllStar Negative Control siRNA*, Quiagen) transfiziert. 72 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und analysiert. A, D) Westernblot Analysen gegen das MYC Protein um die Effektivität des MYC Knock-downs auf Proteinebene zu untersuchen. Exemplarisch wurde ein Westernblot von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. B, E) mRNA-Expressionanalysen von MYC nach MYC Knock-down um die Effektivität des MYC Knock-downs auf mRNA Ebene zu bestimmen. Graphen sind eine Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten. Die p-Werte wurden mit dem zweiseitigem, gepaartem Student's T-Test berechnet (* p < 0,05; ** p < 0,01). C, F) Zusammenfassung der qRT-PCR Analysen von *miR-16-5p*, *miR-15a-5p*, deren Wirtsgen *DLEU2* und der direkten Targetgene von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* (rot = hoch-regulierte Gene, grün = herunter-regulierte Gene, grau = nicht signifikant differenziell exprimierte Gene). Es wurden drei unabhängige Experimente untersucht. QRT-PCR Daten der Gene wurden auf das Referenzgen *ARF1* normalisiert. Die Expression der *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* wurden mittels qRT-PCR untersucht. Für die Expressionsanalyse von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* wurde das *first-strand cDNA synthesis Kit* und *LNATM PCR primer sets* spezifisch für *miR-16-5p*, *miR-15a-5p* und *U6 snRNA* - als endogene Kontrolle - von Exiqon verwendet. Und p-Werte wurden mittels zweiseitigem, gepaartem Student's T-Test berechnet.

In den Gliomzelllinien T98G und U87MG, die einen MYC Knock-down zeigten, war die Expression von *miR-16-5p*, *miR-15a-5p* und *DLEU2* relativ zu Kontroll-behandelten Zellen erhöht (Abbildung 24). Des Weiteren war die mRNA-Expression der direkten Targetgene von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p*, wie *CDK6*, *CCND3*, *CCNE1*, *CDC25A*, *WEE1* und *CHEK1* nach einem MYC Knock-down in T98G und U87MG Zellen,

vermindert. Die *BCL2* Expression war in beiden untersuchten Zelllinien nach Transfektion mit der *siRNA_1* gegen *MYC* vermindert, nicht aber nach einer Transfektion mit der *siRNA_2* gegen *MYC*. Und die *MCL1* mRNA Expression war nach einem Knock-down mit beiden untersuchten siRNAs gegen *MYC* relativ zu Kontroll-transfizierten Zellen nicht verändert.

4.6.4 Die Expression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* wird durch den Knock-down von *HDAC3* induziert

Es wurde in mehreren Studien herausgefunden, dass *MYC* in der Promoterregion von *DLEU2*, dem Wirtsgen von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p*, bindet. Zusätzlich werden durch diese Bindung Histondeazetylasen, insbesondere *HDAC3*, an die Promoterregion rekrutiert, wodurch die Promoterregion hypoazetyliert wird und somit die miRNA-Expression negativ reguliert wird (Chen et al. 2013). Aus diesem Grund analysierte ich in Gliomzellen die *miR-16-5p*, *miR-15a-5p* und *DLEU2* Expression nach *HDAC3* Knock-down.

Als erstes wurde die Effizienz des Knock-downs von *HDAC3* auf Protein- und mRNA-Ebene untersucht. Nach *HDAC3* Knock-down wurde auf Proteinebene in T98G Zellen ein circa 85 %ige und in U251MG Zellen eine circa 70 %ige Reduktion der *HDAC3* Expression ermittelt (Abbildung 25A und D). Auf der mRNA-Ebene war ein ungefähr 75–90 %ige verminderte Expression zu beobachten (Abbildung 25B und E). In T98G und U251MG Gliomzellen wurde nach *HDAC3* Knock-down eine erhöhte Expression von *miR-16-5p*, *miR-15a-5p* und *DLEU2* im Vergleich zu Kontroll-behandelten Zellen gefunden. Des Weiteren war die mRNA-Expression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Targetgenen, wie *CDK6*, *CCND3*, *CCNE1*, *CDC25A*, *WEE1* und *CHEK1* nach *HDAC3* Knock-down vermindert (Abbildung 25C und F). Die *BCL2* Expression war in beiden untersuchten Zelllinien nach einem *HDAC3* Knock-down mit der *siRNA_1* niedriger, nicht aber nach einem Knock-down mit der *siRNA_2*. Die *MCL1* mRNA Expression war weder in der Zelllinie T98G noch in U251MG Zellen nach Transfektion mit der *siRNA_1* im Vergleich zu Kontroll-behandelten Zellen verändert.

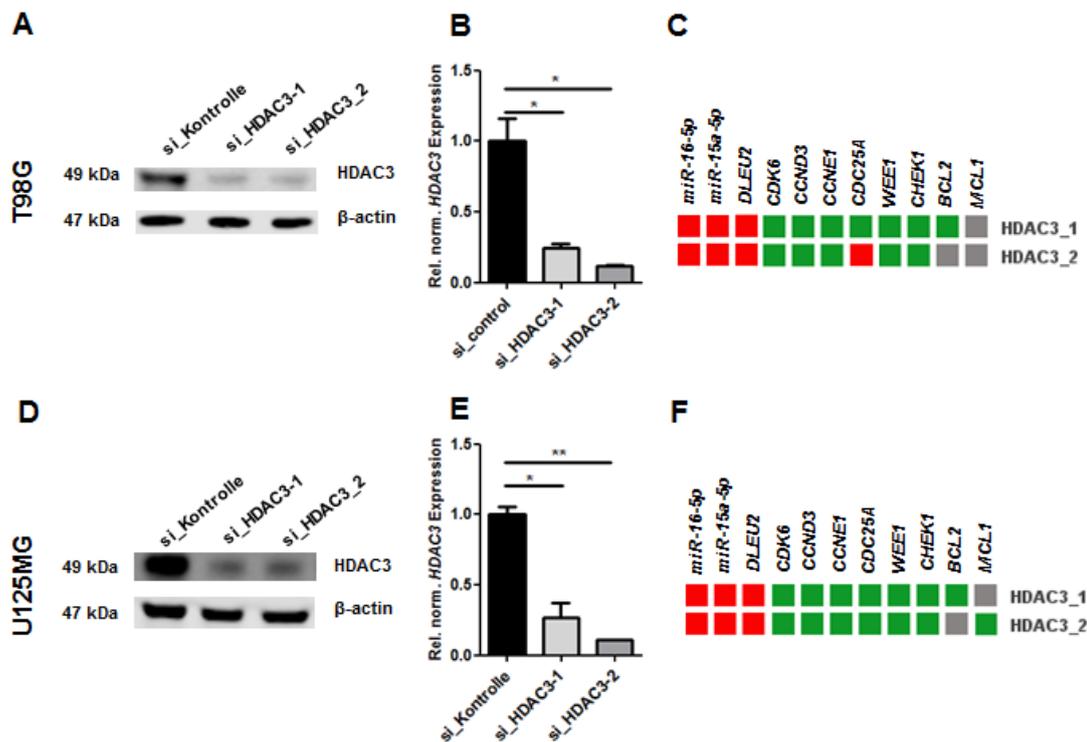


Abbildung 25: HDAC3 Knock-down mittels siRNAs induziert signifikant die Expression von *miR-16-5p*, *miR-15a-5p* und deren Wirtsgen *DLEU2* und hemmt die Expression der direkten Targetgene von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p*. Dargestellt sind die Ergebnisse nach HDAC3 Knock-down auf mRNA- und Proteinebene in T98G und U251MG Gliomzellen. Die Zellen wurden mit 50 nM zweier verschiedener siRNA Moleküle gegen HDAC3 (Quiagen) und Kontroll-siRNAs (*AllStar Negative Control siRNA*, Quiagen) transfiziert. 72 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und analysiert. A, D) Westernblot Analysen auf HDAC3 Expression um die Effektivität des HDAC3 Knock-downs auf Proteinebene zu testen. Exemplarisch wurde ein Westernblot von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. B, E) mRNA-Expressionsanalysen von HDAC3 nach siRNA Transfektion gegen HDAC3 um die Effektivität des HDAC3 Knock-downs auf mRNA Ebene zu bestimmen. Graphen sind eine Zusammenfassung dreier unabhängiger Experimente. Die p-Werte wurden mit dem zweiseitigem, gepaartem Student's T-Test berechnet (* p < 0,05; ** p < 0,01). C, F) Zusammenfassung der qRT-PCR Analysen von *miR-16-5p*, *miR-15a-5p*, deren Wirtsgen *DLEU2* und der direkten Targetgene von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* (rot = hoch-regulierte Gene, grün = herunter-regulierte Gene, grau = nicht differenziell exprimierte Gene). Es wurden drei unabhängige Experimente analysiert. QRT-PCR Daten der Gene wurden auf das Referenzgen *ARF1* normalisiert. Die Expression der *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* wurde mittels qRT-PCR untersucht. Für die Expressionsanalyse von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* wurde das *first-strand cDNA synthesis* Kit und *LNATM PCR primer sets* spezifisch für *miR-16-5p*, *miR-15a-5p* und *U6 snRNA* - als endogene Kontrolle - von Exiqon verwendet. Und p-Werte wurden mittels zweiseitigem, gepaartem Student's T-Test berechnet.

5 Diskussion

5.1 Herunterregulation von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in astrozytären Gliomen

Es gibt immer mehr Belege dafür, dass miRNAs eine wichtige Rolle in der Tumorigenese verschiedener Neoplasien spielen, so auch in Gehirntumoren. In eigenen Vorarbeiten (Forchmann 2011) und Publikationen anderer Arbeitsgruppen (Ciafrè et al. 2005; Yang et al. 2014) konnte gezeigt werden, dass die *miR-16-5p* Expression in astrozytären Gliomen im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe herunterreguliert ist. Für *miR-15a-5p* zeigte sich dagegen bereits in normalen Hirngewebe eine relativ niedrige Expression und es wurden keine Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe gefunden (Forchmann 2011). Beide miRNAs gehören zur *miR-15*-Familie, der unter anderem die miRNAs *miR-15a*, *miR-15b*, *miR-16*, *miR-195* und *miR-457* angehören. *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* sind beide auf Chromosom 13q.14 im Intron 4 des Genes *DLEU2* lokalisiert (Calin et al. 2002; Lerner et al. 2009). In der eigenen Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Expression in *IDH1/2* mutierten Gliomen im Vergleich zu *IDH1/2* Wildtyp Gliomen herunterreguliert ist. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass epigenetische Mechanismen eine Rolle bei der Regulation von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* spielen können, was im Weiteren Betrachtung findet. Darüber hinaus konnte ich zeigen, dass beide miRNAs in sechs etablierten Gliomzelllinien herunterreguliert sind. Weitere Isoformen von *miR-15* und *miR-16* zeigten keine differentielle Expression in astrozytären Gliomen im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe, weshalb ich mich auf *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* fokussiert habe. *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* waren die ersten miRNAs, deren deregulierte Expression in CLL im Zusammenhang mit einem Verlust der chromosomalen Region und der Herunterregulierung der miRNA-Expression beschrieben wurde (Calin et al. 2002). Später zeigten verschiedene Studien eine verminderte Expression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in verschiedenen benignen und malignen Tumoren, darunter Hypophysenadenome (Bottoni et al. 2005) sowie Karzinome der Prostata (Bonci et al. 2008), der Lunge (Bandi et al. 2009), des Pankreas (Shen et al. 2012) und der Brust (Rivas et al. 2012). Im Gegensatz zur

Expressionsanalyse haben sich bis zum heutigen Zeitpunkt nur wenige Studien mit dem Zusammenhang der Expression und der Funktion dieser miRNAs in Gliomen beschäftigt. Von unserer Arbeitsgruppe wurde bereits eine Arbeit veröffentlicht, in der die miRNAs *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* als gliomassoziierte miRNAs beschrieben wurden, welche eine Hochregulation der miRNA-Expression nach Progression von primär niedriggradigen zu sekundär hochgradigen Gliomen bei individuellen Patienten beschreibt (Malzkorn et al. 2008). Dennoch war die Expression beider miRNAs sowohl in den Primärtumoren als auch in den Rezidivtumoren niedriger als in nicht-neoplastischen Hirngewebsproben, was wiederum zu meinen Ergebnissen passt. Auch andere Autoren (Wuchty et al. 2011) berichteten von einer erhöhten *miR-16-5p* Expression in primären Glioblastomen im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe. Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich zum Teil dadurch erklären, dass verschiedene Referenzgewebe verwendet wurden. Zum Anderen fand ich heraus, dass eine Herunterregulation der *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Expression in Gliomen mit einem mutierten *IDH1/2* Gen häufiger zu finden ist als in Gliomen mit einem nicht-mutierten *IDH1/2* Status. Außerdem wurden die Daten in der Studie von Wuchty et al. (2011) anhand einer kleinen Fallzahl mittels Hybridisierung gewonnen und nicht durch eine weitere unabhängige Methode validiert. Des Weiteren wurde bereits ab einem *fold change* von $> 1,0$ von einer Hochregulierung der miRNA gesprochen, während in zahlreichen anderen Veröffentlichungen nur *fold changes* von $> 1,5$ oder $> 2,0$ als Hinweis für eine differenzielle Expression angesehen wurden. Lages et al. (2011) berichteten ebenfalls über eine erhöhte Expression von *miR-16-5p*, nicht aber des Wirtsgenes *DLEU2*, in primären Glioblastomen und Oligodendrogliomen im Vergleich zu Kontroll-Hirngewebe. Die Daten wurden wie bei Wuchty et al. (2011) mittels Hybridisierung gewonnen und dann mittels der RT-PCR Methode mit dem Taqman® MicroRNA Assay validiert. Die Verwendung unterschiedlicher Methoden wie RT-PCR, qRT-low density Array oder Northern-Hybridisierung kann die unterschiedlichen Ergebnisse möglicherweise erklären. In der RT-PCR Analyse wird nur die reife miRNA Form jeder einzelnen miRNA gemessen. Hingegen werden mit Hybridisierungsarrays auch unreife miRNA Formen detektiert. Bei allen Untersuchungen ist die Heterogenität des Tumorgewebes in den verschiedenen Studien ein weiteres Problem, weshalb ich in meiner Studie nur Proben von Tumorpatienten verwendet haben, die einen Tumoranteil

von über 80 % hatten. Des Weiteren können die divergenten Ergebnisse zwischen den Laboren durch die Verwendung von verschiedenen Referenzgenen mitbedingt sein. In vorangegangenen Studien konnte für die miRNA *miR-15a-5p* mittels miRNA Microarray Assay in einer Arbeit eine Reduktion der *miR-15a-5p* Expression in primären Glioblastomen vergleichend mit nicht-neoplastischem Hirngewebe gefunden werden (Xie et al. 2015). Konform mit meinen Ergebnissen wurde in astrozytären Gliomen, die eine *IDH* Mutation aufweisen, eine signifikant verminderte *miR-16-5p* Expression gefunden, was einen Zusammenhang zwischen den mit einer *IDH* Mutation einhergehenden epigenetischen Veränderungen und der *miR-16-5p* Expression nahelegt (Hartmann et al. 2010; Sabha et al. 2014; Brat et al. 2015). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Expression der miRNAs *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in *IDH1/2* mutierten im Vergleich zu *IDH1/2* nicht-mutierten Gliomen herunterreguliert ist.

5.2 Pro-apoptische Wirkung von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in Gliomzellen

Vorangegangene Studien in Gliomzelllinien zeigten tumorhemmende Eigenschaften von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* durch die Inhibierung von Gliomzellproliferation und Invasion (Li et al. 2013; Yang et al. 2014). Auch konnte eine Inhibierung der Proliferationsrate nach *miR-16-5p* oder *miR-15a-5p* Überexpression in drei untersuchten Zelllinien gefunden werden (Forchmann 2011). Konform mit diesen Daten fand ich nach Überexpression von *miR-16-5p* oder *miR-15a-5p* in drei Gliomzelllinien eine Induktion der Apoptose in zwei von drei untersuchten Zelllinien (A172, TP365MG). Dagegen konnte in T98G Zellen keine Änderung der Apoptoserate nach *miR-16-5p* respektive *miR-15a-5p* Transfektion nachgewiesen werden. Ein Grund für die unveränderte Caspase-Aktivität in den T98G Zellen nach Überexpression von *miR-16-5p* beziehungsweise *miR-15a-5p* könnte sein, dass T98G Zellen ein mutiertes *TP53* Gen haben. In verschiedenen anderen Tumoren, wie Karzinomen der Speiseröhre (Zhu et al. 2014) oder des Ovars (Tang et al. 2012), in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (Band et al. 2009, Bandi and Vassella, 2011) und in CLL (Cimmino et al. 2005) wurden anti-proliferative und pro-apoptische Effekte von *miR-16-5p* beschrieben, was die tumorsuppressive Funktion von *miR-16-5p* unterstreicht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die eigenen Ergebnisse dafür sprechen, dass *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* auch in Gliomzellen einen anti-proliferativen und proapoptischen Effekt zeigen.

5.3 Direkte Regulation von zellzyklus- und apoptosesteuernden Targetgenen durch *miR-16-5p* und *miR-15a-5p*

Um den Mechanismus zu verstehen, der für die Inhibierung des Gliomwachstums und die Induktion der Apoptose zuständig ist, wurden acht zellzyklus- und apoptoseregulierende Gene, die eine vorhergesagte und teilweise experimentell bestätigte Bindestelle für *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in der 3'-UTR der jeweiligen Transkripte haben, untersucht. Diese waren *CDK6*, *CCND3*, *CCNE1*, *CDC25A*, *WEE1*, *CHEK1*, *BCL2* und *MCL1*. Nach Überexpression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in sechs Gliomzelllinien konnte eine verminderte mRNA-Expression der vorhergesagten Zielgene *CDK6*, *CCND3*, *CCNE1*, *CDC25A*, *WEE1* und *CHEK1* nachgewiesen werden. Des Weiteren waren die Proteine CDK6, Cyclin D3, Cyclin E1, CDC25A, WEE1, CHK1, BCL2 und MCL1 in *miR-16-5p* und CDK6, Cyclin D3 und CDC25A in *miR-15a-5p* überexprimierenden Zellen signifikant herunterreguliert. In vorangegangenen Studien wurden *CDK6*, *CCND3*, *CCNE1*, *CDC25A* und *BCL2* als direkte Targetgene von *miR-16-5p* beschrieben (Bonci et al. 2008; Liu et al. 2008; Bandi et al. 2009; Lerner et al. 2009; Pothof et al. 2009; Wang et al. 2009). Für *miR-15a-5p* wurden die vorhergesagten Zielgene *CCNE1* (Luo et al. 2013) und *BCL2* (Cimmino et al. 2005; Bonci et al. 2008) als direkte Targetgene bereits bestätigt. Mittels 3'-UTR Luciferase Assay konnte ich die direkte Bindung von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in der 3'-UTR von *WEE1* und *CHK1* zeigen, was während meiner Studie von der Gruppe um Lezina bestätigt wurde (Lezina et al. 2013). Die Bindung von *miR-16-5p* oder *miR-15a-5p* an die respektiven 3'-UTRs wurde durch Mutieren der Bindestellen verhindert, was die Spezifität der entsprechenden Bindung beweist. Weitere 3'-UTR Luciferase Assays bestätigten die direkte Regulation von *MCL1* durch *miR-16-5p* und *miR-15a-5p*. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass eine reduzierte *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Expression in Gliomen das Gliomwachstum durch die Hochregulation der Zellzykluspromotoren *CDK6*, *CCND3*, *CCNE1*, *CDC25A* und Apoptoseinhibitoren *BCL2* und *MCL1* induziert. Darüberhinaus konnte eine

Hochregulation von *WEE1* und *CHEK1* nach verminderter *miR-16-5p* oder *miR-15a-5p* Expression, gefunden werden, was zu einem Gliomzellüberleben durch die Verhinderung der mitotischen Katastrophe als eine Konsequenz auf sehr hohen replikativen Stress führt (Mir et al. 2010; Sorensen und Syljuasen 2012; Cornago et al. 2014).

Die Überexpression von *miR-16-5p* könnte zur Apoptose in Gliomzellen durch die Herunterregulierung von BCL2 und MCL1 führen. Gestützt wird diese Hypothese durch Studien in CLL, in denen eine Korrelation von *miR-16-5p* Herunterregulation und BCL2 sowie MCL1 Überexpression gefunden wurde (Bonci et al. 2008; Liu et al. 2014). Des Weiteren haben verschiedene Studien BCL2 und MCL1 als wichtige Apoptoseinhibitoren in Gliomzellen beschrieben (Roth et al. 2000, Sheng et al. 2010, Xu et al. 2010, Murphy et al. 2014). Zahlreiche Ergebnisse unterstützen die Hypothese, ähnlich zu CLL, dass eine reduzierte *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Expression das Überleben der Gliomzellen durch die Verhinderung der Apoptose durch die Hochregulation von BCL2 und MCL1 fördert. Gleichzeitig führt die *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Herunterregulation zu einer erhöhten Gliomzellproliferation, vermutlich durch eine erleichterte G1/S Transition, die durch die Hochregulation von Zellzykluspromotoren wie CDK6 und CDC25A, die mit erhöhter Gliomzellproliferation assoziiert sind, induziert wird (Yamashita et al. 2010, Chen et al. 2013).

5.4 Überexpression von zellzyklus- und apoptosesteuernden Targetgenen auf mRNA Ebene in astrozytären Gliomen

In Übereinstimmung mit den *in vitro* Daten habe ich auf mRNA Ebene eine signifikante Überexpression von *CDK6* in sGBIV und pGBIV, von *WEE1* und *CHEK1* in AIII, sGBIV und pGBIV und von *MCL1* in AIII und pGBIV relativ zu nicht-neoplastischem Hirngewebe nachgewiesen. Außerdem waren die mRNA Level von *CDC25A* und *BCL2* in astrozytären Gliomen höher als im nicht-neoplastischem Hirngewebe. Für *CCND3* und *CCNE1* wurden keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe in der von uns untersuchten Kohorte gefunden (Toedt et al. 2011). Zusätzlich zeigten vorangegangene Studien eine signifikante *CDK6* Überexpression in Glioblastomen (Li et al. 2012; Chen et al. 2013). In Gliomzelllinien konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene

eine Regulation durch *miR-16-5p* respektive *miR-15a-5p* von CDK6 (Li et al. 2012), WEE1 und CHK1 (Mir et al. 2010; Seol et al. 2011) in malignen Gliomen festgestellt werden. In weiteren Arbeiten wurde beschrieben, dass die *CDC25A* mRNA Expression mit der Proliferationsrate von Gliomen zunimmt (Yamashita et al. 2010). Auch für Cyclin D3 (Hedberg et al. 2002; Zhang et al. 2005) und MCL1 (Beroukhim et al. 2010) wurde eine Überexpression in Gliomen berichtet.

5.5 Regulation der *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Expression in Gliomen

Des Weiteren untersuchte ich, warum die *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Expression in Gliomen, das heißt insbesondere in IDH mutierten astrozytären Gliomen herunterreguliert ist. Die niedrige Expression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in Gliomen im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe kann durch verschiedene epigenetische und genetische Veränderungen verursacht werden. In CLL Studien wurde gezeigt, dass die *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Expression zum einen durch Deletionen auf dem Chromosom 13q14 und zum anderen durch epigenetische Mechanismen wie Histonmodifikationen reduziert ist (Calin et al. 2002; Lerner et al. 2009; Veronese et al. 2014). In unserer untersuchten Gliomserie fanden sich keine cytogenetischen Veränderungen, wie Deletionen auf 13q14. Beide miRNAs *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* liegen im Wirtsgen *DLEU2*. Die reifen miRNAs werden mittels des Drosha-abhängigen Mechanismus (siehe 1.2.1) von ihrem Wirtsgen *DLEU2* ausgehend prozessiert (Lerner et al. 2009). In vorangegangenen Studien wurde in B-Zell Lymphomen und Lungentumoren ein Repression von *DLEU2* / *miR-16-5p* / *miR-15a-5p* durch die Bindung von MYCC in der Promotersequenz von *DLEU2* mit nachfolgender Rekrutierung der Histondeazetylase HDAC3 beschrieben (Lerner et al. 2009; Zhang et al. 2012). In meinen Untersuchungen habe ich Evidenz dafür gefunden, dass der Mechanismus in Gliomen analog ist. Ich beobachtete, dass nach TSA-Behandlung der Gliomzellen, die *DLEU2* / *miR-16-5p* / *miR-15a-5p* Expression signifikant anstieg, was dafür spricht, dass Histonmodifikationen eine Rolle bei der Herunterregulation der miRNAs spielen. Außerdem konnte ich feststellen, dass nach einem siRNA-mediierenden Knockdown von MYCC oder HDAC3 die Expression von *DLEU2* / *miR-16-5p* / *miR-15a-5p* zunahm und die Expression verschiedener Targetgene von

miR-16-5p / *miR-15a-5p* sich entsprechend reduzierte. Weiterhin konnte in unserer Kohorte an Gliomen eine erhöhte mRNA Expression für *MYCC* und *HDAC3 in situ* gefunden werden.

6 Zusammenfassung

MicroRNAs (miRNAs) sind kurze, einzelsträngige, nicht-kodierende RNA-Moleküle, die die Genexpression durch die Destabilisierung der mRNA und/oder Inhibierung der Translation regulieren. Veränderungen der miRNA-Expression wurden in zahlreicher Tumorarten, darunter auch maligne Gliome gefunden. In eigenen Voruntersuchungen im Rahmen der Masterarbeit fand sich eine Herunterregulierung der Expression von *miR-16-5p* in diffusen und anaplastischen Astrozytomen, sekundären Glioblastomen sowie einem Teil der primären Glioblastome im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe, die mittels Reverser stem-loop Transkriptions-PCR detektiert wurde. Des Weiteren war die Expression von *miR-16-5p* und der auf Chromosom 13q14.2 kolokalisierten *miR-15a-5p* geringer in den Gliomen, die eine Mutation im *Isocitrate dehydrogenase 1* oder *2 (IDH1/2)*-Gen hatten. Außerdem war die *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* Expression in etablierten Gliomzelllinien signifikant herunterreguliert. Eine transiente Überexpression von Vorläufermolekülen der miRNA *miR-16-5p* oder *miR-15a-5p*, welche die gleiche Bindungsspezifität aufweisen, reduzierte einerseits die Viabilität- und Proliferationsrate und induzierte andererseits die Apoptoseaktivität von Gliomzellen relativ zu Kontroll-transfizierten Zellen. *In silico*-Analysen sagten Bindestellen für *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* in der 3'-UTR von mehreren Genen voraus, deren Genprodukte in der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose von entscheidender Bedeutung sind, darunter *CDK6*, *CDC25A*, *CCND3*, *CCNE1*, *WEE1*, *CHK1*, *BCL2* und *MCL1*. Überexpression von *miR-16-5p* oder *miR-15a-5p* Vorläufermolekülen in Gliomzellen führte zu einer signifikant erniedrigten Expression von *CDK6*, *CDC25A*, *Cyclin D3*, *Cyclin E1*, *WEE1*, *CHK1*, *BCL1* und *MCL1*. Während *CDK6*, *CDC25A*, *CCND3*, *CCNE1*, *WEE1*, *CHK1* und *BCL2* in der Literatur bereits als direkte Targets von *miR-16-5p* beziehungsweise *miR-15a-5p* beschrieben wurden, konnten in eigenen Experimenten zudem die direkte Bindung dieser miRNAs in der 3'-UTR von *WEE1*, *CHK1* und *MCL1* mittels Luciferase-Assays gezeigt beziehungsweise validiert werden. Konform mit den *in vitro* Daten zeigten die Gene *CDK6*, *WEE1*, *CHK1* und *MCL1* eine im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe erhöhte mRNA-Expression in astrozytären Gliomen. Um die Herunterregulierung von *miR-16-5p* respektive *miR-15a-5p* in Gliomzellen zu untersuchen, wurden siRNA-medierte Knock-down-Experimente für die Gene *MYCC*

und *HDAC3* durchgeführt. Des Weiteren wurden Gliomzellen mit dem Histondeazetylase (HDAC)-Inhibitor Trichostatin A (TSA) behandelt. Diese Experimente zeigten, dass sowohl der Knock-down von MYCC oder HDAC3 als auch eine TSA-Behandlung der Zellen zu einer signifikant erhöhten Expression von *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* als auch deren Wirtsgen *DLEU2* in Gliomzellen führten. Zusammenfassend sprechen die erzielten Ergebnisse dafür, dass *miR-16-5p* und *miR-15a-5p* eine wichtige Rolle in der Pathogenese von astrozytären Gliomen durch die direkte Regulation multipler Regulatoren von Zellzyklus und Apoptose spielen. Zusätzlich ergab sich analog zu Befunden in lymphatischen Tumoren Evidenz dafür, dass für die beobachtete transkriptionelle Repression von *miR-16-5p* in *IDH1*-mutierten astrozytären Gliomen inhibitorische Einflüsse von MYCC und HDAC3 sowie Histonmodifikationen von Bedeutung sind.

7 Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are short, single stranded, non-coding RNA molecules which regulate gene expression by destabilization of the mRNA and/or inhibition of translation. Aberrant expression of miRNAs has been implicated in the pathogenesis of various types of cancer including gliomas. In former work during my master thesis, I detected decreased *miR-16-5p* expression levels relative to non-neoplastic brain tissue in diffuse and anaplastic astrocytomas as well as secondary glioblastomas and a subset of primary glioblastomas. Following up on this finding, I found that expression of *miR-16-5p* and its family member *miR-15a-5p*, which map together at chromosome band 13q14.2, was lower in isocitrate dehydrogenase 1 or 2 (*IDH1/2*) mutant as compared to *IDH1/2* wildtype gliomas, and consistently down-regulated in established glioma cell lines. Functional studies revealed that overexpression of *miR-16-5p* or *miR-15a-5p* precursors inhibited viability and proliferation and increased apoptosis of glioma cells. *In silico* analysis showed binding sites for *miR-16-5p* and *miR-15a-5p* in the 3'-untranslated region of transcripts encoding *CDK6*, *CDC25A*, *CCND3*, *CCNE1*, *WEE1*, *CHK1*, *BCL2* and *MCL1*. Overexpression of *miR-16-5p* or *miR-15a-5p* precursor molecules in glioma cells resulted in down-regulation of CDK6, CDC25A, Cyclin D3, Cyclin E1, WEE1, CHK1, BCL2 and MCL1. While CDK6, CDC25A, Cyclin D3, Cyclin E1 and BCL2 are already experimentally validated *miR-16-5p* targets, I could additionally prove that both *miR-16-5p* and *miR-15a-5p* directly bind to the 3'-untranslated region of transcripts encoding WEE1, CHK1 and MCL1. In line with the *in vitro* data, *CDK6*, *WEE1*, *CHK1* and *MCL1* mRNA levels were significantly increased in malignant glioma tissues when compared to non-neoplastic brain tissue. To investigate potential mechanisms leading to down-regulation of *miR-16-5p* and

miR-15a-5p in glioma cells, siRNA knock-down experiments for *MYCC* and *HDAC3* were performed. Furthermore, glioma cells were treated with the histone deacetylase (HDAC)-inhibitor Trichostatin A (TSA). These experiments revealed that trichostatin A treatment as well as *MYCC* and *HDAC3* knockdown significantly increased expression of *miR-16-5p*, *miR-15a-5p* and their host gene *DLEU2* in glioma cells. Taken together, the experimental results summarized in this thesis suggest an important role of *miR-16-5p* and *miR-15a-5p* down-regulation in the pathogenesis of astrocytic gliomas by facilitating up-regulation of several pro-proliferative and anti-apoptotic proteins. Similar to findings reported in lymphatic tumors, the own data suggest that the observed transcriptional repression of *miR-16-5p* in astrocytic gliomas is related to increased *MYCC* and *HDAC3* expression as well as histone modifications.

8 Literaturverzeichnis

miRBase. Online verfügbar unter <http://www.mirbase.org/>, zuletzt geprüft am 06.11.2014.

TargetScanHuman 6.2 (2014). Online verfügbar unter <http://www.targetscan.org/>, zuletzt aktualisiert am 16.09.2014, zuletzt geprüft am 06.11.2014.

Abbott, AL; Alvarez-Saavedra, E; Miska, EA; Lau, NC; Bartel, DP.; Horvitz, HR et al. (2015): The let-7 MicroRNA family members mir-48, mir-84, and mir-241 function together to regulate developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Cell* 9 (3), S. 403–414.

Aldape, K; Zadeh, G; Mansouri, S; Reifenberger, G; Deimling, A (2015): Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol* 129 (6), S. 829–848.

Al-Dimassi, S; Abou-Antoun, T; El-Sibai, M (2014): Cancer cell resistance mechanisms: a mini review. *Clin Transl Oncol* 16 (6), S. 511–516.

Ambros, V (2004): The functions of animal microRNAs. *Nature* 431 (7006), S. 350–355.

Aqeilan, RI; Calin, GA; Croce, CM (2010): MiR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death and Differ* 17 (2), S. 215–220.

Aravin, AA.; Lagos-Quintana, M; Yalcin, A; Zavolan, M; Marks, D; Snyder, B et al. (2003): The Small RNA Profile during *Drosophila melanogaster* Development. *Dev Cell* 5 (2), S. 337–350.

Balss, J; Meyer, J; Mueller, W; Korshunov, A; Hartmann, C; Deimling, A (2008): Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol* 116 (6), S. 597–602.

Bandi, N; Vassella, E (2011): MiR-34a and miR-15a/16 are co-regulated in non-small cell lung cancer and control cell cycle progression in a synergistic and Rb-dependent manner. *Mol Cancer* 10, S. 55.

Bandi, N; Zbinden, S; Gugger, M; Arnold, M; Kocher, V; Hasan, L et al. (2009): MiR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and

are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 69 (13), S. 5553–5559.

Bartel, DP. (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116 (2), S. 281–297.

Bartkova, J; Horejsí, Z; Koed, K; Krämer, A; Tort, F; Zieger, K et al. (2005): DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434 (7035), S. 864–870.

Bernstein, E; Caudy, AA; Hammond, SM; Hannon, GJ (2001): Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409 (6818), S. 363–366.

Bernstein, E; Kim, SY; Carmell, MA.; Murchison, EP.; Alcorn, H; Li, MZ. et al. (2003): Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 35 (3), S. 215–217.

Bigner, SH; Vogelstein, B (1990): Cytogenetics and molecular genetics of malignant gliomas and medulloblastoma. *Brain Pathol* 1 (1), S. 12–18.

Bonci, D; Coppola, V; Musumeci, M; Addario, A; D'Urso, L; Collura, D et al. (2008): The miR-15a/miR-16-1 cluster controls prostate cancer progression by targeting multiple oncogenic activities. *Eur Urol Sup* 7 (3), S. 271.

Bottoni, A; Piccin, D; Tagliati, F; Luchin, A; Zatelli, MC; Uberti, ECD (2005): MiR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. *J Cell Physiol* 204 (1), S. 280–285.

Brat, DJ; Verhaak, RGW; Aldape, Kenneth D; Yung, WKA; Salama, SR; Cooper, LAD et al. (2015): Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med* 372 (26), S. 2481–2498.

Brennecke, J; Stark, A; Russell, RB; Cohen, SM (2005): Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 3 (3), S. e85.

Brower, JV; Clark, PA; Lyon, W; Kuo, JS (2014): MicroRNAs in cancer: Glioblastoma and glioblastoma cancer stem cells. *Neurochem Int* 77C, S. 68–77.

Calin, GA; Dumitru, CD; Shimizu, M; Bichi, R; Zupo, S; Noch, E et al. (2002): Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at

13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (24), S. 15524–15529.

Calin, GA; Croce, CM (2006): Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance. *Semin Oncol* 33 (2), S. 167–173.

Calin, GA; Ferracin, M; Cimmino, A; Di Leva, G; Shimizu, M; Wojcik, SE et al. (2005): A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 353 (17), S. 1793–1801.

Calin, GA; Sevignani, C; Dumitru, CD; Hyslop, T; Noch, E; Yendamuri, S et al. (2004): Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (9), S. 2999–3004.

Chan, JA; Krichevsky, AM; Kosik, KS (2005): MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 65 (14), S. 6029–6033.

Chang, T; Yu, D; Lee, Y; Wentzel, EA; Arking, DE; West, M. et al. (2008): Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet* 40 (1), S. 43–50.

Chen, S; Chen, H; Chen, S; Huang, C; Chen, P; Wu, TE et al. (2013): MicroRNA-495 inhibits proliferation of glioblastoma multiforme cells by downregulating cyclin-dependent kinase 6. *World J Surg Oncol* 11, S. 87.

Ciafrè, SA; Galardi, S; Mangiola, A; Ferracin, M; Liu, C; Sabatino, G et al. (2005): Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 334 (4), S. 1351–1358.

Cimmino, A; Calin, GA; Fabbri, M; Iorio, MV; Ferracin, M; Shimizu, M et al. (2005): miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (39), S. 13944–13949.

Cornago, M; Garcia-Alberich, C; Blasco-Angulo, N; Vall-Llaura, N; Nager, M; Herreros, J et al. (2014): Histone deacetylase inhibitors promote glioma cell death by G2 checkpoint abrogation leading to mitotic catastrophe. *Cell Death and Dis* 5, S. e1435.

- Davis, GM; Haas, MA; Pockock, R (2015): MicroRNAs: Not "Fine-Tuners" but Key Regulators of Neuronal Development and Function. *Front Neurol* 6, S. 245.
- Denli, AM; Tops, BBJ; Plasterk, RHA; Ketting, RF; Hannon, GJ (2004): Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432 (7014), S. 231–235.
- Diederichs, S; Haber, DA (2007): Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 131 (6), S. 1097–1108.
- Dong, JT; Boyd, JC; Frierson, HF (2001): Loss of heterozygosity at 13q14 and 13q21 in high grade, high stage prostate cancer. *Prostate* 49 (3), S. 166–171.
- Figueroa, ME; Abdel-Wahab, O; Lu, C; Ward, PS; Patel, J; Shih, A et al. (2010): Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 18 (6), S. 553–567.
- Finnerty, JR; Wang, W; Hébert, SS; Wilfred, BR; Mao, G; Nelson, PT (2010): The miR-15/107 group of microRNA genes: evolutionary biology, cellular functions, and roles in human diseases. *J Mol Biol* 402 (3), S. 491–509.
- Follert, P; Cremer, H; Beclin, C (2014): MicroRNAs in brain development and function: a matter of flexibility and stability. *Front Mol Neurosci* 7, S. 5.
- Forchmann, A (2011): Molecular Analysis of WEE1 Kinase and its Regulation by MicroRNAs in Gliomas. Masterarbeit, S. 44-46.
- Gardiner, AS; Twiss, JL; Perrone-Bizzozero, NI (2015): Competing Interactions of RNA-Binding Proteins, MicroRNAs, and Their Targets Control Neuronal Development and Function. *Biomolecules* 5 (4), S. 2903–2918.
- Garzon, R; Calin, GA; Croce, CM (2009): MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med* 60, S. 167–179.
- Godlewski, J; Nowicki, MO; Bronisz, A; Williams, S; Otsuki, A; Nuovo, G et al. (2008): Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res* 68 (22), S. 9125–9130.
- Griffiths-Jones, S (2004): The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 32, S. 109-111.

- Ha, M; Kim, V (2014): Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Moll Cell Bio* 15 (8), S. 509–524.
- Hammond, SM (2005): Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett* 579 (26), S. 5822–5829.
- Han, J. (2004): The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18 (24), S. 3016–3027.
- Han, L; Witmer, PD; Casey, E; Valle, D; Sukumar, S (2007): DNA methylation regulates MicroRNA expression. *Cancer Biol Ther* 6 (8), S. 1284–1288.
- Hanahan, D; Weinberg, RA (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144 (5), S. 646–674.
- Hartmann, C; Hentschel, B; Wick, W; Capper, D; Felsberg, J; Simon, M et al. (2010): Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol* 120 (6), S. 707–718.
- Hedberg, Y; Roos, G; Ljungberg, B; Landberg, G (2002): Cyclin D3 protein content in human renal cell carcinoma in relation to cyclin D1 and clinico-pathological parameters. *Acta Oncol* 41 (2), S. 175–181.
- Hegi, ME; Diserens, A; Gorlia, T; Hamou, M; Tribolet, N; Weller, M et al. (2005): MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352 (10), S. 997–1003.
- Hermansen, SK; Kristensen, BW (2013): MicroRNA biomarkers in glioblastoma. *J Neurooncol* 114 (1), S. 13–23.
- Hermanson, M; Funahashi, K; Hartman, M; Claesson-Welsh, L; Heldin, CH; Westermark, B; Nistér, M (1992): 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* 52 (11), S. 3213–3219.

Iyengar, BR.; Choudhary, A; Sarangdhar, MA; Venkatesh, KV; Gadgil, CJ; Pillai, B (2014): Non-coding RNA interact to regulate neuronal development and function. *Front Cell Neurosci* 8, S. 47.

Jiang, Q; Liu, B; Yuan, T (2013): MicroRNA-16 inhibits bladder cancer proliferation by targeting Cyclin D1. *Asian Pac J Cancer Prev* 14 (7), S. 4127–4130.

Killela, PJ; Pirozzi, CJ; Healy, P; Reitman, ZJ; Lipp, E; Rasheed, BA et al. (2014): Mutations in IDH1, IDH2, and in the TERT promoter define clinically distinct subgroups of adult malignant gliomas. *Oncotarget* 5 (6), S. 1515–1525.

Killela, PJ; Reitman, ZJ; Jiao, Y; Bettegowda, C; Agrawal, N; Diaz, LA Jr et al. (2013): TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci USA* 110 (15), S. 6021–6026.

Lages, E; Guttin, A; El Atifi, M; Ramus, C; Ipas, H; Dupré, I et al. (2011): MicroRNA and target protein patterns reveal physiopathological features of glioma subtypes. *PLoS ONE* 6 (5), S. e20600.

Landgraf, P; Rusu, M; Sheridan, R; Sewer, A; Iovino, N; Aravin, A et al. (2007): A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129 (7), S. 1401–1414.

Lee, RC; Feinbaum, RL; Ambros, V (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75 (5), S. 843–854.

Lee, Y (2002): MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21 (17), S. 4663–4670.

Lee, Y; Kim, M; Han, J; Yeom, K; Lee, S; Baek, SH; Kim, VN (2004): MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23 (20), S. 4051–4060.

Lerner, M; Harada, M; Loven, J; Castro, J; Davis, Z; Oscier, D et al. (2009): DLEU2, frequently deleted in malignancy, functions as a critical host gene of the cell cycle inhibitory microRNAs miR-15a and miR-16-1. *Exp Cell Res* 315 (17), S. 2941–2952.

- Lezina, L; Purmessur, N; Antonov, AV; Ivanova, T; Karpova, E; Krishan, K et al. (2013): MiR-16 and miR-26a target checkpoint kinases Wee1 and Chk1 in response to p53 activation by genotoxic stress. *Cell Death Dis* 4, e953.
- Li, B; He, H; Tao, B; Zhao, Z; Hu, G; Luo, C et al. (2012): Knockdown of CDK6 enhances glioma sensitivity to chemotherapy. *Oncol Rep* 28 (3), S. 909–914.
- Li, Y; Xu, J; Chen, H; Bai, J; Li, S; Zhao, Z et al. (2013): Comprehensive analysis of the functional microRNA-mRNA regulatory network identifies miRNA signatures associated with glioma malignant progression. *Nucleic Acids Res* 41 (22), e203.
- Liesenberg, F (2012): Aberrant expression of micro RNA in gliomas: Molecular mechanisms, functional consequences and clinical significance. *Inaugural-Disseration*, S. 37-42.
- Liu, J; Chen, G; Feng, L; Zhang, W; Pelicano, H; Wang, F et al. (2014): Loss of p53 and altered miR15-a/16-1 - MCL-1 pathway in CLL: insights from TCL1-Tg;p53(-/-) mouse model and primary human leukemia cells. *Leukemia* 28 (1), S. 118–128.
- Liu, Q; Fu, H; Sun, F; Zhang, H; Tie, Y; Zhu, J et al. (2008): MiR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes. *Nucleic Acids Res* 36 (16), S. 5391–5404.
- Livak, KJ; Schmittgen, TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4), S. 402–408.
- Louis, DN; Ohgaki, H; Wiestler, OD; Cavenee, WK; Burger, PC; Jouvett, A et al. (2007): The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114 (2), S. 97–109.
- Lu, J; Getz, G; Miska, EA; Alvarez-Saavedra, E; Lamb, J; Peck, D et al. (2005): MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435 (7043), S. 834–838.
- Lujambio, A; Lowe, SW (2012): The microcosmos of cancer. *Nature* 482 (7385), S. 347–355.

Luo, Q; Li, Xiaoyu; Li, J; Kong, X; Zhang, J; Chen, L et al. (2013): MiR-15a is underexpressed and inhibits the cell cycle by targeting CCNE1 in breast cancer. *Int J of Oncol* 43 (4), S. 1212–1218.

Makeyev, EV; Zhang, J; Carrasco, MA; Maniatis, T (2007): The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 27 (3), S. 435–448.

Malmstrom, A; Gronberg, BH; Marosi, C; Stupp, R; Frappaz, D; Schultz, H et al. (2012): Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13 (9), S. 916–926.

Malzkorn, B; Wolter, M; Grzendowski, M; Stuehler, K; Reifenberger, G (2008): Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of astrocytic gliomas. *Acta Neuropathol* 116 (3), S. 350.

Meister, G; Landthaler, M; Patkaniowska, A; Dorsett, Y; Teng, G; Tuschl, T (2004): Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15 (2), S. 185–197.

Mir, SE; De Witt Hamer, PC; Krawczyk, PM; Balaj, L; Claes, A; Niers, JM. et al. (2010): In silico analysis of kinase expression identifies WEE1 as a gatekeeper against mitotic catastrophe in glioblastoma. *Cancer Cell* 18 (3), S. 244–257.

Miska, EA; Alvarez-Saavedra, E; Townsend, M; Yoshii, A; Sestan, N; Rakic, P et al. (2004): Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol* 5 (9), S. 68.

Noushmehr, H; Weisenberger, DJ; Diefes, K; Phillips, HS; Pujara, K; Berman, BP et al. (2010): Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer cell* 17 (5), S. 510–522.

O'Donnell, KA; Wentzel, EA; Zeller, KI; Dang, CV; Mendell, JT (2005): c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435 (7043), S. 839–843.

Ofir, M; Hacoen, D; Ginsberg, D (2011): MiR-15 and miR-16 are direct transcriptional targets of E2F1 that limit E2F-induced proliferation by targeting cyclin E. *Mol Cancer Res* 9 (4), S. 440–447.

- Ohgaki, H; Kleihues, P (2007): Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170 (5), S. 1445–1453.
- Orellana, EA; Kasinski, AL (2015): MicroRNAs in Cancer: A Historical Perspective on the Path from Discovery to Therapy. *Cancers* 7 (3), S. 1388–1405.
- Orian, JM; Vasilopoulos, K; Yoshida, S; Kaye, AH; Chow, CW; Gonzales, MF (1992): Overexpression of multiple oncogenes related to histological grade of astrocytic glioma. *Br J Canc* 66 (1), S. 106–112.
- Ørom, UA; Nielsen, FC; Lund, AH (2008): MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* 30 (4), S. 460–471.
- Ostrom, QT; Gittleman, H; Fulop, J; Liu, M; Blanda, R; Kromer, C et al. (2015): CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *J Neuro-Oncol* 17, S. iv1-iv62.
- Panda, AC; Sahu, I; Kulkarni, SD; Martindale, JL; Abdelmohsen, K; Vindu, A et al. (2014): MiR-196b-mediated translation regulation of mouse insulin2 via the 5'UTR. *PLoS* 9 (7), S. e101084.
- Papagiannakopoulos, T; Friedmann-Morvinski, D; Neveu, P; Dugas, JC; Gill, RM; Huillard, E et al. (2012): Pro-neural miR-128 is a glioma tumor suppressor that targets mitogenic kinases. *Oncogene* 31 (15), S. 1884–1895.
- Parsons, DW; Jones, S; Zhang, X; Lin, JC; Leary, RJ; Angenendt, P et al. (2008): An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321 (5897), S. 1807–1812.
- Pavlidis, N; Fizazi, K (2005): Cancer of unknown primary (CUP). *Crit Rev Oncol Hematol* 54 (3), S. 243–250.
- Perry, A; Tonk, V; McIntire, DD; White, CL (1997): Interphase cytogenetic (in situ hybridization) analysis of astrocytomas using archival, formalin-fixed, paraffin-embedded tissue and nonfluorescent light microscopy. *Am J Clin Pathol* 108 (2), S. 166–174.

Pothof, J; Verkaik, NS; van IJcken, W; Wiemer, EAC; Ta, VTB; van der Horst, GTJ et al. (2009): MicroRNA-mediated gene silencing modulates the UV-induced DNA-damage response. *EMBO J* 28 (14), S. 2090–2099.

Qian, J; Jiang, B; Li, M; Chen, J; Fang, M (2013): Prognostic significance of microRNA-16 expression in human colorectal cancer. *World J Surg* 37 (12), S. 2944–2949.

Ramaswamy, S; Tamayo, P; Rifkin, R; Mukherjee, S; Yeang, CH; Angelo, M et al. (2001): Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (26), S. 15149–15154.

Rao, SAM; Santosh, V; Somasundaram, K (2010): Genome-wide expression profiling identifies deregulated miRNAs in malignant astrocytoma. *Mod Pathol* 23 (10), S. 1404–1417.

Reid, G; Pel, ME; Kirschner, MB; Cheng, YY; Mugridge, N; Weiss, J et al. (2013): Restoring expression of miR-16: a novel approach to therapy for malignant pleural mesothelioma. *Ann Oncol* 24 (12), S. 3128–3135.

Reifenberger, G; Collins, VP (2004): Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med* 82 (10), S. 656–670.

Reifenberger, G; Hentschel, B; Felsberg, J; Schackert, G; Simon, M; Schnell, O et al. (2012): Predictive impact of MGMT promoter methylation in glioblastoma of the elderly. *Int J Cancer* 131 (6), S. 1342–1350.

Riemenschneider, MJ; Reifenberger, G (2010): Molecular neuropathology of low-grade gliomas and its clinical impact. *Adv Tech Stand Neurosurg* 35, S. 35–64.

Riemenschneider, MJ; Jeuken, JWM; Wesseling, P; Reifenberger, G (2010): Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol* 120 (5), S. 567–584.

Riemenschneider, MJ; Reifenberger, G (2009): Molecular neuropathology of gliomas. *Int J Mol Sci* 10 (1), S. 184–212.

Rivas, MA; Venturutti, L; Huang, Y-W; Schillaci, R; Huang, TH-M; Elizalde, PV (2012): Downregulation of the tumor-suppressor miR-16 via progesterin-mediated

oncogenic signaling contributes to breast cancer development. *Breast Cancer Res* 14 (3), S. R77.

Sabha, N; Knobbe, CB; Maganti, M; Al Omar, S; Bernstein, M; Cairns, R et al. (2014): Analysis of IDH mutation, 1p/19q deletion, and PTEN loss delineates prognosis in clinical low-grade diffuse gliomas. *J Neuro-Oncol* 16 (7), S. 914–923.

Saito, Y; Liang, G; Egger, G; Friedman, JM; Chuang, JC; Coetzee, GA; Jones, PA (2006): Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 9 (6), S. 435–443.

Sampath, D; Liu, C; Vasan, K; Sulda, M; Pudevalli, VK; Wierda, WG; Keating, MJ (2012): Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 119 (5), S. 1162–1172.

Schwarz, DS; Hutvagner, G; Du, T; Xu, Z; Aronin, N; Zamore, PD (2003): Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell* 115 (2), S. 199–208.

Seol, HJ; Yoo, HY; Jin, J; Joo, KM; Kim, H-S; Yoon, SJ et al. (2011): The expression of DNA damage checkpoint proteins and prognostic implication in metastatic brain tumors. *Oncol Res* 19 (8-9), S. 381–390.

Shen, J; Wan, R; Hu, G; Yang, L; Xiong, J; Wang, F et al. (2012): MiR-15b and miR-16 induce the apoptosis of rat activated pancreatic stellate cells by targeting Bcl-2 in vitro. *Pancreatology* 12 (2), S. 91–99.

Shi, Z-M; Wang, J; Yan, Z; You, Y-P; Li, C; Qian, X et al. (2012): MiR-128 inhibits tumor growth and angiogenesis by targeting p70S6K1. *PLoS* 7 (3), S. e32709.

Silber, J; Lim, DA; Petritsch, C; Persson, AI; Maunakea, AK; Yu, M et al. (2008): miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med* 6, S. 14.

Singh, NK (2016): MicroRNAs Databases: Developmental Methodologies, Structural and Functional Annotations. In: *Interdiscipl Sci Comput Life Sci*, 21 S.

Sorensen, CS; Syljuasen, RG (2012): Safeguarding genome integrity: the checkpoint kinases ATR, CHK1 and WEE1 restrain CDK activity during normal DNA replication. *Nucleic Acids Res* 40 (2), S. 477–486.

Stupp, R; Hegi, ME; Mason, WP; van den Bent, MJ; Taphoorn, MJB; Janzer, RC et al. (2009): Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 10 (5), S. 459–466.

Su, AI; Welsh, JB; Sapinoso, LM; Kern, SG; Dimitrov, P; Lapp, H et al. (2001): Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures. *Cancer Res* 61 (20), S. 7388–7393.

Suzuki, H; Aoki, K; Chiba, K; Sato, Y; Shiozawa, Y; Shiraishi, Y et al. (2015): Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nature Genet* 47 (5), S. 458–468.

Takeshita, F; Patrawala, L; Osaki, M; Takahashi, R; Yamamoto, Y; Kosaka, N et al. (2010): Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol Ther* 18 (1), S. 181–187.

Tepel, M; Roerig, P; Wolter, M; Gutmann, DH; Perry, A; Reifenberger, G; Riemenschneider, MJ (2008): Frequent promoter hypermethylation and transcriptional downregulation of the NDRG2 gene at 14q11.2 in primary glioblastoma. *Int J Cancer* 123 (9), S. 2080–2086.

Toedt, G; Barbus, S; Wolter, M; Felsberg, J; Tews, B; Blond, F et al. (2011): Molecular signatures classify astrocytic gliomas by IDH1 mutation status. *Int J Cancer* 128 (5), S. 1095–1103.

Toyota, M; Suzuki, H; Sasaki, Y; Maruyama, R; Imai, K; Shinomura, Y; Tokino, T (2008): Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res* 68 (11), S. 4123–4132.

Vasudevan, S; Tong, Y; Steitz, JA (2007): Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318 (5858), S. 1931–1934.

- Veronese, A; Pepe, F; Chiacchia, J; Pagotto, S; Lanuti, P; Veschi, S et al. (2014): Allele-specific loss and transcription of the miR-15a/16-1 cluster in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 29 (1), 86-95.
- Wang, F; Fu, X-D; Zhou, Y; Zhang, Y (2009): Down-regulation of the cyclin E1 oncogene expression by microRNA-16-1 induces cell cycle arrest in human cancer cells. *BMB Reports* 42 (11), S. 725–730.
- Ward, PS; Patel, J; Wise, DR; Abdel-Wahab, O; Bennett, BD; Collier, HA et al. (2010): The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* 17 (3), S. 225–234.
- Watanabe, T; Katayama, Y; Yoshino, A; Yachi, K; Ohta, T; Ogino, A et al. (2007): Aberrant hypermethylation of p14ARF and O6-methylguanine-DNA methyltransferase genes in astrocytoma progression. *Brain Pathol* 17 (1), S. 5–10.
- Weller, M; Felsberg, J; Hartmann, C; Berger, H; Steinbach, JP; Schramm, J et al. (2009): Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol* 27 (34), S. 5743–5750.
- Weller, M; Wick, W; Aldape, K; Brada, M; Berger, M; Pfister, SM; Nishikawa, R; Rosenthal, M; Wen, PY; Stupp, R; Reifenberger, G (2015): Glioma. *Nat Rev Dis Primer*, 1 (15040), S. 1-18.
- Wick, W; Platten, M; Meisner, C; Felsberg, J; Tabatabai, G; Simon, M et al. (2012): Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *The Lancet. Oncol* 13 (7), S. 707–715.
- Wick, W; Weller, M; van den Bent, M; Sanson, M; Weiler, M; Deimling, A et al. (2014): MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nat Rev Neurol* 10 (7), S. 372–385.
- Wightman, B; Ha, I; Ruvkun, G (1993): Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75 (5), S. 855–862.

Winter, J; Jung, S; Keller, S; Gregory, RI; Diederichs, S (2009): Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11 (3), S. 228–234.

Woldemichael, BT; Mansuy, IM (2016): Micro-RNAs in cognition and cognitive disorders: Potential for novel biomarkers and therapeutics. *Biochem Pharmacol* 104, S. 1–7.

Wuchty, S; Arjona, D; Li, A; Kotliarov, Y; Walling, J; Ahn, S et al. (2011): Prediction of Associations between microRNAs and Gene Expression in Glioma Biology. *PLoS* 6 (2), S. e14681.

Xie, T; Liu, P; Chen, L; Chen, Z; Luo, Y; Chen, X et al. (2015): MicroRNA-15a down-regulation is associated with adverse prognosis in human glioma. *Clin Transl Oncol*, 17(7), 504-10.

Xu, W; Yang, H; Liu, Y; Yang, Y; Wang, P; Kim, S-H et al. (2011): Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 19 (1), S. 17–30.

Yamashita, Y; Kasugai, I; Sato, M; Tanuma, N; Sato, I; Nomura, M et al. (2010): CDC25A mRNA levels significantly correlate with Ki-67 expression in human glioma samples. *J. Neurooncol* 100 (1), S. 43–49.

Yan, H; Parsons, DW; Jin, G; McLendon, R; Rasheed, BA; Yuan, W et al. (2009): IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 360 (8), S. 765–773.

Yang, T-Q; Lu, X-J; Wu, T-F; Ding, D-D; Zhao, Z-H; Chen, G-L et al. (2014): MicroRNA-16 inhibits glioma cell growth and invasion through suppression of BCL2 and the nuclear factor- kappa B1/MMP9 signaling pathway. *Cancer Sci* 105 (3), S. 265–271.

Yi, R; Qin, Y; Macara, IG; Cullen, BR (2003): Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17 (24), S. 3011–3016.

Zhang, X; Chen, X; Lin, J; Lwin, T; Wright, G; Moscinski, LC et al. (2012): Myc represses miR-15a/miR-16-1 expression through recruitment of HDAC3 in mantle cell and other non-Hodgkin B-cell lymphomas. *Oncogene* 31 (24), S. 3002–3008.

Zhang, X; Zhao, M; Huang, A-Y; Fei, Z; Zhang, W; Wang, X-L (2005): The effect of cyclin D expression on cell proliferation in human gliomas. *J Clin Neurosci* 12 (2), S. 166–168.

Zhang, X; Wan, G; Mlotshwa, S; Vance, V; Berger, FG; Chen, H; Lu, X (2010): Oncogenic Wip1 phosphatase is inhibited by miR-16 in the DNA damage signaling pathway. *Cancer Res* 70 (18), S. 7176–7186.

Zhou, X; Duan, X; Qian, J; Li, F (2009): Abundant conserved microRNA target sites in the 5'-untranslated region and coding sequence. *Genetica* 137 (2), S. 159–164.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Guido Reifenberger für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf anzufertigen, sowie für die freundliche Unterstützung beim Durchführen dieser Arbeiten und das Überlassen des sehr interessanten Themas.

Bei Frau Prof. Dr. Christine Rose bedanke ich mich besonders für die Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit seitens der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Mein weiterer großer Dank gilt Herrn Dr. Bastian Malzkorn für die fundierte Betreuung sowie die motivierende Beratung und Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe am Institut für Neuropathologie für die praktische Unterstützung der experimentellen Arbeiten und die zahlreichen Ratschläge, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken. Insbesondere möchte ich hier Frau Dr. Marietta Wolter erwähnen, die die Fäden im Labor zusammenhält und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Frau Dr. Franziska Liesenberg danke ich für die Überlassung von miRNA-Expressionsdaten in astrozytären Gliomen. Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. Marc Zapatka für die bioinformatische Normalisierung der miRNA-Expressionsdaten von Frau Dr. Liesenberg. Ein herzlicher Dank gilt zudem meiner langjährigen Bürokollegin Angela Veiser und Miriam Knühmann, mit denen meine Promotionszeit sehr produktiv und spannend war.

Herzlich bedanke ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder Georg, die mich immer unterstützt haben. Meinem Verlobten Patrick danke ich herzlich für seine Unterstützung, Geduld und den starken Rückhalt, den er mir während meiner gesamten Promotionszeit gab.

10 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Ort, Datum

Düsseldorf, 03.05.2016

Anneliese Forchmann