

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

Die Rolle von microRNAs für die Chemotherapieresistenz von Glioblastomen gegenüber Temozolomid

Dissertation

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

**vorgelegt von
Gennadi Schechtmann**

2019

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

gez.:

Dekan/in: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Univ.-Prof. Dr. med. Guido Reifenberger

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Peter Brenneisen

Widmung

Für meine Eltern. Dass ich so bin, wie ich bin.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Stojcheva N, Schechtmann G, Sass S, Roth P, Florea AM, Stefanski A, Stühler K, Wolter M, Müller NS, Theis FJ, Weller M, Reifenberger G, Hapold C., (2016), MicroRNA-138 promotes acquired alkylator resistance in glioblastoma by targeting the Bcl-2-interacting mediator BIM. *Oncotarget*. (7), 12937-12950.

Zusammenfassung

Glioblastome sind die häufigsten malignen Gehirntumoren. Die Behandlung besteht aus einer chirurgischen Resektion, einer Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) sowie einer Bestrahlung, wodurch das Überleben des Patienten um mehrere Monate bis einige Jahre verlängert werden kann. Eine primäre oder unter der Therapie erworbene Resistenz der Tumorzellen gegenüber TMZ ist ein wesentlicher Faktor für die ungünstige Prognose der Patienten, der zu einem Fortschreiten bzw. erneuten Auftreten der Erkrankung beiträgt, die letzten Endes letal verläuft. Im Falle verschiedener Tumorerkrankungen konnte bereits gezeigt werden, dass eine deregulierte Expression von kleinen, nicht-kodierenden RNAs, d.h. microRNAs (miRNAs), das Ansprechen von Tumorzellen auf Chemotherapie beeinflussen und zu einer Therapieresistenzentwicklung beitragen kann.

In dieser Dissertationsarbeit wurden mittels Microarray-basierter Expressionsanalysen 12 miRNAs identifiziert, die eine differenzielle Expression zwischen parentalen und TMZ-resistenten LN-18, LNT-229 und LN-308 Glioblastomzelllinien zeigten. Die differenzielle Expression von fünf (*miR-192-5p*, *miR-138-5p*, *miR-181d-5p*, *miR-210-5p* und *miR-9-5p*) dieser 12 miRNAs wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR in den Zelllinien validiert. Eine Expressionsanalyse dieser Kandidaten-miRNAs in unbehandelten Primärtumorproben und Rezidivtumorproben nach Radiochemotherapie mit TMZ von 10 Patienten mit Glioblastomen ergab, dass *miR-192-5p* in sieben und *miR-138-5p* in neun Rezidivtumorproben im Vergleich zu den zugehörigen Primärtumoren verstärkt exprimiert waren. *MiR-9-5p* zeigte dagegen nur in einem Rezidivtumor eine differenzielle, d.h. verminderte Expression. Zusätzlich wurden funktionelle *in vitro* Untersuchungen nach gezielter Hoch- bzw. Herunterregulation der jeweiligen Kandidaten-miRNA in den Glioblastomzelllinien mittels transienter Transfektion von miRIDIAN™ miRNA-Inhibitoren bzw. miRNA-Mimics durchgeführt. Im Zellüberlebenstest wurden die transfizierten Glioblastomzelllinien einer zunehmenden TMZ-Konzentration ausgesetzt und der Einfluss der modulierten miRNAs auf die TMZ-Sensitivität bzw. -Resistenz überprüft. Eine *miR-138-5p* Überexpression erhöhte die TMZ-Resistenz in den parentalen LN-308 Zellen. Eine *miR-138-5p*-Inhibition hatte dagegen keinen Einfluss auf die TMZ-Sensitivität dieser Zellen. *MiR-9-5p* war im Gegensatz zu *miR-138-5p* und *miR-192-5p* signifikant in TMZ-resistenten LN-308 Zellen herunterreguliert. Eine Überexpression von *miR-9-5p* in den TMZ-resistenten LN-308 Zellen führte allerdings nicht zu einer Steigerung der TMZ-Sensitivität. Zusammenfassend gelang es in den eigenen Untersuchungen, sowohl in parentalen versus TMZ-resistenten Glioblastomzelllinien als auch in Gewebeproben von primären und nach Radiochemotherapie rezidivierten Glioblastomen differenziell exprimierte miRNAs zu identifizieren. Von diesen hatte *miR-138-5p* in kultivierten Gliomzellen einen direkten Einfluss auf die TMZ-Resistenz, dessen molekularer Mechanismus in Folgearbeiten weitergehend aufgeklärt werden konnte (Stojcheva *et al.*, *Oncotarget* 2016; 7 (11). 12937-50). Somit haben die eigenen Arbeiten zu einem verbesserten Verständnis der Rolle von miRNAs für die TMZ-Resistenz von malignen Gliomen beigetragen.

Summary

Glioblastomas are the most common malignant primary brain tumors. The treatment comprising surgical resection, radiation and chemotherapy with temozolomide (TMZ) may prolong patient survival for only months to few years. Primary or acquired resistance of the tumor cells to TMZ is an important factor for the unfavorable prognosis of the patients and contributes to disease progression and tumor recurrence, ultimately leading to the death of the patient. Recent studies have shown that deregulated expression of small, noncoding RNAs, i.e., microRNAs (miRNAs), may influence chemotherapy response and the development of therapy resistance in various cancers.

In this dissertation, microarray-based miRNA expression analyses of parental (TMZ-sensitive) and TMZ-resistant LN-18, LNT-229 and LN-308 glioma cell lines revealed a set of differentially expressed miRNAs, 12 of which were subjected to targeted validation analyses. Five of these 12 miRNAs (*miR-192-5p*, *miR-138-5p*, *miR-181d-5p*, *miR-210-5p*, and *miR-9-5p*) were validated by quantitative real-time PCR in the glioma cell lines. In addition, expression analysis of these candidate miRNAs was carried out in pairs of untreated primary tumor and recurrent tumor following TMZ treatment obtained from 10 glioblastoma patients. These studies revealed that *miR-192-5p* exhibited increased expression levels in seven and *miR-138-5p* in nine recurrent tumor specimens compared to the corresponding primary tumors. In contrast, the expression of *miR-9-5p* was downregulated in only one recurrent tumor relative to the respective primary tumor. Selected differentially expressed candidate miRNAs were selectively up- or down-regulated in glioma cell lines *in vitro* using transient transfection with miRIDIAN™ miRNA mimics or inhibitors, followed by exposure to increasing TMZ concentrations and assessment of cell survival in order to examine the influence of the modulated miRNA on TMZ sensitivity *in vitro*. While *miR-138-5p* overexpression increased TMZ resistance in the parental LN-308 cells, *miR-138-5p* inhibition had no effect on the TMZ sensitivity of these cells. In contrast to *miR-138-5p* and *miR-192-5p*, *miR-9-5p* was significantly downregulated in TMZ-resistant LN-308 cells. However, overexpression of *miR-9-5p* in LN-308 TMZ-resistant cells did not increase TMZ sensitivity.

In summary, differentially expressed miRNAs were identified in TMZ-resistant versus parental glioma cell lines and in primary versus recurrent tumor samples from glioblastoma patients. *In vitro* studies revealed that *miR-138-5p* modulates TMZ resistance in cultured glioma cells. The molecular mechanisms underlying the effect of *miR-138-5p* on TMZ resistance were further elucidated in follow-up studies (Stojcheva et al., *Oncotarget* 2016; 7 (11). 12937-50). Thus, this dissertation contributed to an improved understanding of the role of miRNAs in TMZ resistance of malignant gliomas.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| AIC | 5-Aminoimidazole-4-carboxamid |
| BER | DNA-Basenexzisionsreparatur (<i>DNA base excision repair</i>) |
| BRAF | Protoonkogen <i>BRAF</i> (<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>) |
| cDNA | Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>Complementary desoxyribonucleic acid</i>) |
| CT | Computertomographie |
| °C | Grad Celsius |
| Da | Dalton |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified eagle medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>) |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| Exiqon-System | miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR-System |
| Fc | <i>fold change</i> |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| GBIV | Glioblastom WHO-Grad IV |
| IDH | Isocitrat-Dehydrogenase |
| IDL | Insertion/Deletion Loop |
| kda | Kilo-Dalton |
| MDC | Methyldiazoniumkation |
| MDR1 | <i>Multidrug-Resistance-Protein 1</i> |
| O6-MeG | O-6-Methylguanin |
| MGMT | <i>O-6-Methylguanin-DNA Methyltransferase</i> |
| min | <i>Minute</i> |
| miRNA | MicroRNA |
| ml | Milliliter |
| MMR | DNA-Mismatch-Reparaturproteine |
| mRNA | <i>Boten-RNA (Messenger ribonucleic acid)</i> |
| MRT | <i>Magnetresonanztomographie</i> |
| MSH2 | DNA-Mismatch-Reparaturprotein MSH2 |

| | |
|------------------|----------------------------------------------------------------|
| MSH6 | DNA-Mismatch-Reparaturprotein MSH6 |
| MTIC | 5-(3-Methyltriazen-1-yl)-Imidazole-4-carboxamid |
| MW | <i>Mittelwert</i> |
| NB | <i>Nicht-neoplastisches Hirngewebe (Normal brain)</i> |
| NC | <i>Negative Kontrolle (Negative control)</i> |
| NOS | <i>Nicht anders bestimmt (not otherwise specified)</i> |
| NSCLC | <i>Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom</i> |
| nm | <i>Nanometer</i> |
| P | <i>Parental</i> |
| PCR | <i>Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)</i> |
| qPCR | <i>Quantitative (Echtzeit) PCR</i> |
| RT-qPCR | Reverse Transkriptase-qPCR |
| PNAs | Peptid-Nukleinsäuren (<i>Peptide nucleic acids</i>) |
| PTCH1 | <i>Homolog of Drosophila patched 1</i> |
| R8-PNA221 | Anti-miR-221 PNA-Octaarginin Konjugate |
| pri-miRNA | Primäre miRNA (<i>primary miRNA</i>) |
| R | <i>Resistent</i> |
| RISC | <i>RNA-induced silencing complex</i> |
| RNA | <i>Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)</i> |
| snRNA | Kleine nukleäre RNA (<i>Small nuclear ribonucleic acid</i>) |
| TMZ | Temozolomid |
| TSC1 / 2 | <i>Tuberous Sclerosis 1 / 2</i> |
| v/v | <i>Volumenanteil</i> |
| WHO | <i>Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)</i> |
| w/v | Massenanteil |
| µl | Mikroliter |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | Gliome | 2 |
| 1.1.1 | Glioblastome | 2 |
| 1.1.2 | Klassifikation der Gliome..... | 3 |
| 1.1.3 | Die Bluthirnschranke und Rolle von ABC-Transportern | 4 |
| 1.1.4 | Rolle von TMZ in der Chemotherapie von Gliomen | 4 |
| 1.2 | Resistenzmechanismen gegenüber TMZ..... | 6 |
| 1.2.1 | O6-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT)..... | 6 |
| 1.2.2 | DNA-Mismatch-Reparaturproteine (MMR-System) | 7 |
| 1.2.3 | Basenexzisionsreparatur | 8 |
| 1.3 | MicroRNAs..... | 9 |
| 1.3.1 | MicroRNA-Biogenese | 9 |
| 1.3.2 | MicroRNAs in Gliomen..... | 10 |
| 1.3.3 | MicroRNAs im Zusammenhang mit TMZ-Resistenz | 11 |
| 1.4 | Arbeitsziele | 13 |
| 2 | Material..... | 14 |
| 2.1 | Laborgeräte | 14 |
| 2.2 | Software..... | 14 |
| 2.3 | Reagenzien, Chemikalien und Kits..... | 15 |
| 2.4 | Gewebeproben von Glioblastom-Patienten | 18 |
| 2.5 | Glioblastomzellen und Kulturbedingungen..... | 19 |
| 2.6 | Sequenzen der MicroRNAs | 20 |
| 3 | Methoden..... | 22 |
| 3.1 | Microarray-basierte miRNA-Expressionsanalyse..... | 22 |
| 3.2 | Bioinformatische und statistische Analyse der Microarray-basierten Expressionsdaten | 22 |
| 3.3 | Bestimmung des miRNA-Expressionsniveaus mittels quantitativer Echtzeit-PCR .. | 22 |
| 3.3.1 | RNA Extraktion aus Zellen und Hirntumorgewebe | 22 |
| 3.3.2 | Polymerasekettenreaktion (PCR) und quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)..... | 23 |
| 3.3.3 | Das Prinzip der quantitativen Echtzeit PCR (qPCR) mit SYBR®Green oder TaqMan®-Sonde..... | 23 |
| 3.3.4 | cDNA-Erststrangsynthese und Echtzeit-PCR nach dem miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR-System..... | 26 |

| | | |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.5 | cDNA-Erststrangsynthese und qPCR nach dem TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription System..... | 28 |
| 3.3.6 | Auswertung der qPCR-Läufe..... | 30 |
| 3.4 | Agarosegelelektrophorese | 31 |
| 3.5 | Transiente Transfektion der Glioblastomzelllinien (Überexpression / Inhibierung der microRNA)..... | 31 |
| 3.6 | Zellzahlbestimmung mit Trypanblau | 32 |
| 3.7 | Zellüberlebenstest („ <i>cell survival assay</i> “) | 33 |
| 3.8 | Statistische Analysen..... | 34 |
| 4 | Ergebnisse..... | 35 |
| 4.1 | Identifizierung von TMZ-Resistenz-assoziierten miRNAs in Glioblastomzelllinien..... | 35 |
| 4.2 | Identifizierung differenziell exprimierter miRNAs durch paarweisen Vergleich der parentalen <i>versus</i> TMZ-resistenten LNT-229, LN-308 und LN-18 Gliomzelllinien..... | 35 |
| 4.3 | Identifizierung differenziell exprimierter miRNAs durch gruppenweisen Vergleich der parentalen <i>versus</i> TMZ-resistenten LNT-229, LN-308 und LN-18 Gliomzelllinien..... | 37 |
| 4.4 | Identifizierung differenziell exprimierter miRNAs durch bioinformatische Auswertung der parentalen <i>versus</i> TMZ-resistenten LNT-229, LN-308 und LN-18 Gliomzelllinien..... | 38 |
| 4.5 | Validierung der differentiellen Expression ausgewählter miRNAs in Glioblastomzellen mittels quantitativer RT-PCR..... | 40 |
| 4.6 | Expressionsanalyse ausgewählter miRNA-Kandidaten in Rezidivgliompaaren mittels quantitativer RT-PCR | 42 |
| 4.7 | Expressionsanalyse von <i>miR-192-5p</i> in gepaarten Primär- und Rezidivgliomen..... | 44 |
| 4.8 | Expressionsanalyse von <i>miR-138-5p</i> in gepaarten Primär- und Rezidivgliomen..... | 45 |
| 4.9 | Funktionelle Analysen zur Rolle ausgewählter miRNAs für das Ansprechen von Gliomzellen auf TMZ | 46 |
| 4.10 | Modulation der Expression ausgewählter miRNAs durch Transfektion der Gliomzellen mit miRIDIAN™ microRNA Hairpin Inhibitors oder miRIDIAN™ microRNA Mimics | 46 |
| 4.11 | Auswirkung der Transfektion von Gliomzellen mit <i>miR-138-5p</i> Mimic-Molekülen auf die TMZ-Sensitivität..... | 49 |
| 4.12 | Auswirkung der Transfektion von Gliomzellen mit <i>miR-138-5p</i> Inhibitor-Molekülen auf die TMZ-Sensitivität..... | 51 |
| 4.13 | Auswirkung der Transfektion von Gliomzellen mit <i>miR-9-5p</i> Mimic- und Inhibitor-Molekülen auf die TMZ-Sensitivität | 53 |
| 5 | Diskussion..... | 56 |

| | | |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.1 | Verstärkte Expression von <i>miR-192-5p</i> in Rezidivglioblastomen und in TMZ-resistenten LNT-229 und LN-18 Gliomzelllinien | 58 |
| 5.2 | Verstärkte Expression von <i>miR-138-5p</i> in Rezidivglioblastomen und TMZ-resistenten LN-308 Gliomzelllinien | 59 |
| 5.3 | Verminderte Expression von <i>miR-9-5p</i> in TMZ-resistenten LN-308 Glioblastomzelllinie..... | 62 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 64 |

1 Einleitung

Glioblastome sind die häufigsten malignen Gehirntumore (Ricard *et al.*, 2012). Die Behandlung besteht aus einer chirurgischen Resektion, einer Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) sowie einer Bestrahlung, wodurch das Überleben des Patienten um einige Monate bis Jahre verlängert werden kann (Stupp *et al.*, 2005). TMZ ist ein alkylierendes Chemotherapeutikum, das oral verabreicht wird und u.a. durch die Alkylierung der O6-Position von Guanin zu einer Störung der DNA Replikation führt. Durch die Einführung von TMZ als Chemotherapeutikum konnte in Kombination mit Bestrahlung ein medianes Überleben von 14,6 Monaten erreicht werden, im Vergleich zu 12,1 Monaten bei Patienten, die nur eine Radiotherapie und kein TMZ erhalten haben (Stupp *et al.*, 2005). Der kritische Faktor ist die primäre oder sekundäre, d.h. erworbene Resistenz der Tumorzellen gegenüber TMZ, wodurch es zu einem erneuten Fortschreiten der Erkrankung kommt, die letzten Endes letal endet. Weniger als 10% aller Patienten mit einem Glioblastom überleben 5 Jahre nach Diagnosestellung (Stupp *et al.*, 2009). Die O6-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT) spielt bei der Resistenz gegen TMZ eine wichtige Rolle. MGMT ist ein Reparaturenzym, welches die durch TMZ verursachte Methylierung der DNA rückgängig macht und dadurch zur Resistenzentwicklung gegenüber TMZ beiträgt. In ca. 40% der Glioblastome wird MGMT durch eine Methylierung der im Promotor lokalisierten CpG-Insel inaktiviert und der Tumor spricht auf die Chemotherapie an, ist also TMZ-sensitiv. Doch auch anfangs TMZ-sensitive Tumore entwickeln im Verlauf der Behandlung eine Resistenz, wodurch es zum Wiederauftreten des Glioms kommt (Hegi *et al.*, 2005). Dies deutet daraufhin, dass es noch weitere Resistenzmechanismen geben muss. Bis heute ist die Entwicklung der Resistenzmechanismen nicht vollständig aufgeklärt und es bedarf weiterer Forschung, um effizientere Behandlungsmaßnahmen zu finden und so das Überleben von Glioblastompatienten zu verlängern bzw. den Tumor nachhaltig zu besiegen.

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, nicht kodierende RNA-Moleküle, die post-transkriptional die Proteinsynthese hemmen oder zum Abbau der Ziel-RNA führen (Bartel, 2004). Für einige Tumorerkrankungen konnte bereits gezeigt werden, dass eine deregulierte miRNA Expression die Chemotherapieresistenz beeinflussen kann (Hummel *et al.*, 2010; H. Chen *et al.*, 2015). In Studien an Gliomzelllinien konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von *miR-195*, *miR-455-3p* oder *miR-10a* mit einer TMZ-Resistenz einhergeht und in Patienten mit primären

Glioblastomen eine Herunterregulation der *miR-181b* und *miR-181c* mit besserem Ansprechen auf TMZ korreliert (Slaby *et al.*, 2010; Ujifuku *et al.*, 2010).

Ziel dieser Arbeit ist es, miRNAs zu identifizieren, die in TMZ-sensitiven und TMZ-resistenten Glioblastomzelllinien differenziell exprimiert sind. Die differenzielle Expression der miRNA-Kandidaten soll dann in Primär- und Rezidivtumorproben von Glioblastompatienten validiert werden, die mit TMZ behandelt wurden. Anschließend sollen differenziell exprimierte miRNA Kandidaten funktionell untersucht werden, insbesondere, welchen Einfluss eine Modulation der Expression dieser miRNAs auf die Chemotherapieresistenz von Gliomzellen gegenüber TMZ hat.

1.1 Gliome

1.1.1 Glioblastome

Glioblastome (GBIV) gehören zu der Gruppe der diffusen astrozytären Tumore, WHO Grad IV, und sind die häufigsten malignen Gehirntumore im Erwachsenen (Ricard *et al.*, 2012). Sie haben eine Inzidenz von 3,19 pro 100.000 Einwohner und das mediane Alter der Patienten bei der Diagnosestellung beträgt 64 Jahre, wobei Männer häufiger als Frauen betroffen sind (1,42:1) (Ostrom *et al.*, 2014). Die Lokalisation des Glioblastoms ist meist supratentorial. Die Ursachen, die zur Entstehung des Glioblastoms führen, sind noch nicht vollständig geklärt. Häufig treten Glioblastome spontan auf. Erblich bedingte Erkrankungen, wie das Li-Fraumeni-Syndrom oder das Turcot-Syndrom sowie hohe Dosen ionisierender Strahlung, können das Auftreten begünstigen (Johansson *et al.*, 2016). Zu den Symptomen, die bei Glioblastompatienten auftreten, gehören Kopfschmerzen, Krämpfe, Gedächtnisstörungen, Persönlichkeitsveränderungen sowie neurologische Defizite. Bei den Kopfschmerzen handelt es sich um einen Spannungskopfschmerz, der Patienten häufig morgens aus dem Schlaf reißt. Ein steigender kranialer Druck kann bei den Betroffenen zu Übelkeit und Erbrechen führen. Die Diagnosestellung erfolgt mittels Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT). Typischerweise kann man eine randständige Kontrastmittelaufnahme (ringförmiges Enhancement) des Glioblastoms sehen, mit einem

peritumoralem Ödem. Weiterhin erscheint der Tumor in der Bildgebung unregelmäßig geformt (Wen *et al.*, 2008).

1.1.2 Klassifikation der Gliome

Während gemäß früherer WHO („*World Health Organisation*“)-Klassifikationen der Tumoren des zentralen Nervensystems Gliome vor allem über die mikroskopische Begutachtung gefärbter Schnittpräparate charakterisiert wurden (vgl. Louis *et al.*, 2007), findet sich in der WHO-Klassifikation der Tumore des ZNS von 2016 ein neuer Ansatz. Hier werden nicht nur die histologischen (phänotypischen) Parameter berücksichtigt, sondern molekulargenetische Untersuchungen werden zum ersten Mal zu einem festen Bestandteil bei der Diagnosestellung (Louis *et al.*, 2016). Daraus ergeben sich Änderungen in der Nomenklatur. Wurde in der WHO-Klassifikation von 2007 lediglich ein „diffuses Astrozytom“ diagnostiziert, so wird in der neuen, überarbeiteten WHO-Klassifikation eine bestimmte molekulargenetische Veränderung, d.h. eine Mutation im *Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) 1* oder *2*-Gen, mit aufgeführt: „Diffuses Astrozytom, IDH-mutiert“. Ist das Gen in der bestimmten Tumorart nicht mutiert, so wird dies als „Wildtyp“ gekennzeichnet, z.B. „Diffuses Astrocytom, IDH-Wildtyp“. NOS („*not otherwise specified*“) verdeutlicht, dass aufgrund fehlender genetischer Information keine eindeutige Klassifizierung erfolgen kann.

Die Gruppierung der einzelnen Tumorentitäten hat sich zudem weiterentwickelt. Es werden nun Tumore zusammen gruppiert, die sich über die Art des Wachstums (z.B. diffus infiltrativ) und der verantwortlichen Mutation („*shared genetic driver mutations*“) ähneln. Desweiteren sind in der Gruppierung Tumorentitäten mit einer ähnlichen Prognose sowie ähnlichen Therapieschemata berücksichtigt. So werden diffuse Astrozytome und Oligodendrogliome zu einer Gruppe zusammengefasst. Nicht mehr zu dieser Gruppe werden pilozystische Astrozytome gezählt, die häufig eine Veränderung im Protoonkogen *BRAF* aufweisen, oder subependymale Riesenzellastrozytome, die durch Mutationen in den Genen *TSC1* (*Tuberous-sclerosis 1*) oder *TSC2* (*Tuberous-sclerosis 2*) charakterisiert sind. Die Gruppe der diffusen Astrozytome und Oligodendrogliome wird weiter danach spezifiziert, ob eine 1p/19q-Deletion und eine Mutation im *IDH1/2*-Gen vorliegt und entsprechend, wie oben beschrieben, gekennzeichnet (Louis *et al.*, 2016).

Die zur Gruppe der diffusen Astrozytome zählenden Glioblastome werden unterteilt in IDH-Wildtyp, IDH-mutiert und NOS, für Tumore in denen keine IDH-Bestimmung erfolgen kann. In ca. 90% der Fälle findet sich beim Glioblastom die IDH-Wildtyp-Sequenz. Dabei handelt es

sich meist um primäre, *de novo* auftretende Glioblastome. In ca. 10% der Fälle liegt eine IDH-Mutation vor. Diese Mutation ist typisch für sekundäre Glioblastome (Ohgaki *et al.*, 2013). Der Patient ist beim sekundären Glioblastom meist jünger (medianes Alter 44 Jahre) und hatte in der Vergangenheit bereits ein Vorgänger-Gliom WHO Grad II oder III (Ohgaki *et al.*, 2005).

1.1.3 Die Bluthirnschranke und Rolle von ABC-Transportern

Glioblastome haben aufgrund ihrer anatomischen Lage naturgemäß eine Resistenz gegenüber bestimmten Medikamenten, die die Bluthirnschranke passieren müssen (Abbott, 2013). Mitverantwortlich für diese Resistenz sind Enzyme der ABC-Transporter Familie, die fremde Substanzen aus den Zellen entfernen und damit für eine Mehrfachresistenz („*multiple drug resistance*“) sorgen (Gottesman *et al.*, 2002). Im Gehirn von Mäusen und Ratten wurde eine Überexpression der ABC-Transporter in der Blut-Hirn-Schranke festgestellt. Die Vermutung liegt nahe, dass eine verminderte Expression bzw. Inhibierung der ABC-Transporter ein möglicher Therapieansatz gegen den Tumor wäre. Tatsächlich ist es bis dato nicht gelungen, einen Inhibitor zu finden, der einerseits den ABC-Transporter erfolgreich inhibiert, andererseits in seiner Konzentration den normalen Gehirnzellen nicht schadet. Zu den Medikamenten, die relativ gut die Bluthirnschranke passieren können, gehören DNA alkylierende Substanzen wie TMZ und die Nitrosoharnstoffe. Diese werden daher zur Therapie von Glioblastomen eingesetzt (Hartz *et al.*, 2011; Stavrovskaya *et al.*, 2016).

1.1.4 Rolle von TMZ in der Chemotherapie von Gliomen

Temozolomid (TMZ) ist ein kleines (194 Da) lipophiles Molekül, welches als alkylierende Substanz der Klasse der Imidazotetrazine angehört. Als Prodrug ist es unter saurem pH-Wert stabil und kann daher oral verabreicht werden, da es von der Magensäure nicht angegriffen wird (Newlands *et al.*, 1992). Über einem pH-Wert von 7,0 ist es dagegen labil und hat bei einem pH-Wert von 7,4 eine Halbwertszeit von weniger als 2 Stunden (Tsang *et al.*, 1990). Dies hat eine wirkungsphysiologische Konsequenz, denn die Tumorzellen haben eine basische Umgebung, die dazu führt, dass das Prodrug aktiviert wird, d.h. dass TMZ in ein Methyltriazen 5-(3-Methyltriazen-1-yl)-Imidazole-4-carboxamid (MTIC) zerfällt, welches mit Wasser zu 5-Aminoimidazole-4-carboxamid (AIC) und dem hochreaktiven Methyldiazoniumkation (MDC) reagiert. MDC ist für die Methylierung der DNA an

verschiedenen Positionen verantwortlich, d.h. es überträgt eine Methylgruppe (-CH₃) an eine der Nukleinbasen der DNA. Zu 70% erfolgt die Methylierung an der N7-Position der Base Guanin (N7-MeG), zu 9% an der N3-Position von Adenin (N3-MeA) und nur zu 6% an der O6-Position von Guanin (O6-MeG). Obwohl in 70% der Fälle die Methylierung an der N7-Position von Guanin stattfindet, wirkt TMZ vor allem durch die Methylierung der O6-Position zytotoxisch. Während der DNA Replikation paaren normalerweise Guanin und Cytosin miteinander. Durch die Methylierung paart stattdessen O6-MeG mit Thymin, wodurch DNA-Mismatch-Reparaturproteine (MMR) aktiviert werden (Zhang *et al.*, 2012). Die MMR versuchen nun, den Fehler zu beheben und schneiden Thymin zwar heraus, O6-MeG persistiert stattdessen weiterhin in der DNA, wodurch Einzelstrangbrüche entstehen und die Zelle in der Phase G2/M in den Zellzyklusarrest und letzten Endes in die Apoptose übergeht (Mojas *et al.*, 2007). N7-MeG ist nicht so zytotoxisch wie O6-MeG. N3-MeA ist zwar hoch zytotoxisch, wird aber genauso wie N7-MeG direkt durch das DNA-Basensexzisionsreparatur (BER)-System herausgeschnitten. Die wichtigsten Reparaturmechanismen, die einen Einfluss auf die TMZ-Wirkung haben, sind die O6-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT), MMR und BER. Damit die TMZ-Behandlung zu einer Apoptose der Tumorzellen führt, muss das MMR-System funktionieren und das Reparaturenzym MGMT sollte inaktiv sein (Zhang *et al.*, 2012). Seit der Einführung von TMZ konnte das 2-Jahres-Überleben der Glioblastompatienten nach Diagnosestellung von 10,4 % bei konventioneller Behandlung nur mit Radiotherapie auf 26,5% gesteigert werden, wenn Radiotherapie zusammen mit TMZ kombiniert wird (Minniti *et al.*, 2009). TMZ wird dabei begleitend („concomitant“) zur Radiotherapie für 6 Wochen, an 5 Tagen / Woche mit einer Konzentration von 75 mg / m² Körperoberfläche (KOF) verabreicht. Nach etwa 4 Wochen Pause wird TMZ adjuvant an 5 Tagen / Woche in 6 Zyklen (ein Zyklus entspricht 28 Tagen) verabreicht. Die Dosis wird dabei von 150 mg / m² KOF auf bis zu 200 mg / m² KOF erhöht. TMZ verursacht als Nebenwirkung eine Lymphozytopenie, wodurch das Risiko für opportunistische Infektionen, insbesondere *Pneumocystis carinii*, zunimmt und Patienten daher eine Prophylaxe gegen die Infektion erhalten. Als weitere Nebenwirkung kann TMZ zu Erbrechen führen, welches durch Antiemetika gelindert werden kann (Stupp *et al.*, 2005).

1.2 Resistenzmechanismen gegenüber TMZ

1.2.1 O6-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT)

Die O6-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT) ist ein DNA-Reparaturenzym, welches das mutagene O6-Alkylguanin Addukt von der DNA entfernt. Das *MGMT*-Gen ist am telomerischen Ende des langen Arms vom Chromosom 10 lokalisiert (Natarajan *et al.*, 1992). Das *MGMT*-Genprodukt ist 21 kDa groß und kommt sowohl im Zytosol, als auch im Zellkern vor (Lim *et al.*, 1996). Die Methylgruppe wird auf Cystein (Cys 145) übertragen und führt zum Verbrauch von MGMT („suicide reaction“) (Tano *et al.*, 1990). Das inaktivierte MGMT wird letztendlich durch den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg entsorgt (Srivenugopal *et al.*, 1996). Ist MGMT in den Tumorzellen aktiv, so gelingt es den Zellen die durch TMZ verursachte O6-Guanin-Methylierung wieder zu reparieren, in dem die auf Guanin übertragene Methylgruppe wieder entfernt wird (Abb. 1). Somit kann der Zellzyklus weiter ablaufen und die Wirkung von TMZ aufgehoben werden, d.h. die Zellen weisen eine natürliche Resistenz gegenüber TMZ auf. In ca. 40% der Fälle liegt bei den Patienten mit einem Glioblastom, IDH-Wildtyp eine *MGMT*-Promotorhypermethylierung vor, wodurch MGMT inaktiv ist, keine Reparatur mehr stattfindet und TMZ seine Wirkung entfalten kann (Hegi *et al.*, 2005; Parker *et al.*, 2015).

Der Methylierungsstatus des *MGMT*-Genpromotors ist damit ein wichtiger Biomarker, der voraussagt, ob die Tumorzellen auf TMZ sensitiv reagieren werden (Hegi *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2011; Karsy *et al.*, 2015). Eine *MGMT*-Promotorhypermethylierung geht mit einem verlängerten Überleben der Patienten einher. Das durchschnittliche Überleben von Patienten mit einer *MGMT*-Promotorhypermethylierung liegt bei 21 Monaten (Hegi *et al.*, 2005) und für Patienten, die 5 Jahre überlebt haben, ist der Promotormethylierungsstatus von *MGMT* der wichtigste Biomarker (Stupp *et al.*, 2009). Ob die *MGMT*-Promotorhypermethylierung in Tumorrezidiven erhalten bleibt, ist bisher noch nicht ganz klar, denn bisherige Studien kommen zu verschiedenen Ergebnissen. Während Brandes *et al.* (2017) von einer Veränderung in der Promotormethylierung spricht, konnten Felsberg *et al.* (2011) in einer Studie mit 80 Patienten zeigen, dass der *MGMT*-Promotor in 88% der Fälle in Tumorrezidiven weiterhin im hypermethylierten Zustand vorliegt, also MGMT inaktiv bleibt und dass das Fortschreiten der Erkrankung unter anderem mit der veränderten Proteinexpression in *MMR*-Genen einhergeht (Felsberg *et al.*, 2011). Auf die Expression von MGMT haben auch Glucocorticoide und Bestrahlung (Grombacher *et al.*, 1996) einen Einfluß, die Bestandteil des gängigen Therapieregimes sind.

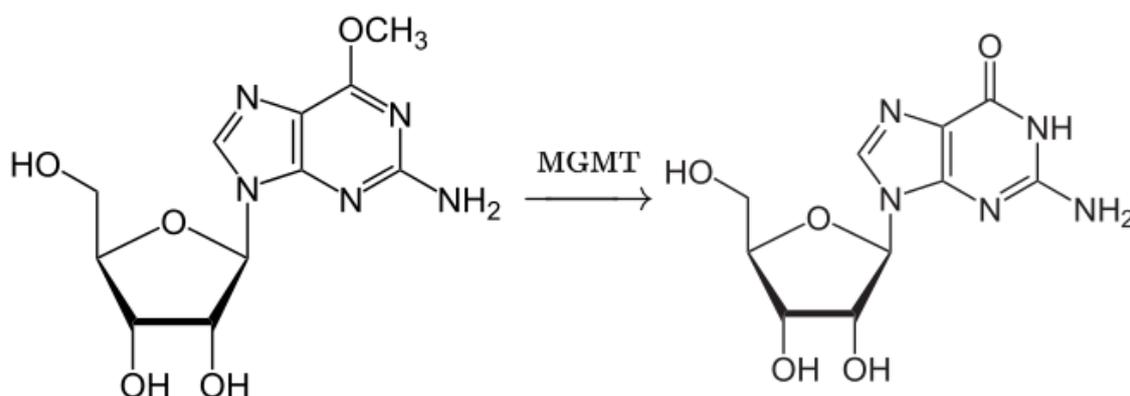


Abb. 1: MGMT entfernt die durch TMZ angehängte Methylgruppe an Position O6 des Guanins und reduziert 6-O-Methylguanosin zu Guanosin (abgewandelt nach Mitra, 2007).

1.2.2 DNA-Mismatch-Reparaturproteine (MMR-System)

Die DNA-Mismatch-Reparaturproteine (MMR) erkennen Fehlbindungen zwischen gegenüberliegenden Basenpaaren eines DNA-Strangs, aber auch sogenannte Insertion/Deletion Loops (IDL), die während der DNA-Replikation entstehen können. Diese Fehlbildungen können dann in einem Multiproteinkomplex, in den verschiedene MMR-Proteine involviert sind, herausgeschnitten werden und die DNA-Synthese kann somit weiter korrekt ablaufen (Bignami *et al.*, 2003). Der Verlust oder Mutationen in den *MMR*-Genen führen zum Anhäufen von Basenfehlbildungen, Replikationsfehlern und weiteren spontanen Mutationen. Dadurch steigt das Risiko an diversen Tumorarten zu erkranken. So hat man in Studien festgestellt, dass eine Mutation im MMR-Gen *hMSH2* oder *hMLH1* zu 80% zur Entstehung vom hereditären nicht-Polyposis-assoziierten kolorektalen Karzinom (HNPCC) führt. Dieses ist assoziiert mit dem Entstehen von weiteren Tumorarten wie z.B. Ovarial-, Endometrium- und Magenkarzinomen sowie Tumore der ableitenden Harnwege (Jiricny *et al.*, 2000; Bignami *et al.*, 2003).

Im Glioblastom fungiert die Expression der MMR-Proteine als ein wichtiger Biomarker, um abzuschätzen, wie sensitiv die Tumorzellen auf TMZ reagieren. Wie im Kapitel 1.1.4 beschrieben, ist ein intaktes MMR-System erforderlich, damit Zellen nach TMZ-Behandlung in die Apoptose gehen können. Durch das Herausschneiden von Thymin kommt es im Verlauf der Replikation zu Einzelstrangbrüchen. Dadurch wird eine Signalkaskade aktiviert, die letzten Endes zur Zellapoptose führt. Ist das MMR-System jedoch nicht intakt, so entstehen

Basenfehlbildungen, Mutationen und IDLs in der DNA. Diese Fehler werden jedoch nicht repariert und das Signal, welches die Zellapoptose einleitet, bleibt aus (Bignami *et al.*, 2003). Ein defizientes MMR-System resultiert in erhöhter Resistenz gegenüber TMZ, unabhängig vom *MGMT* Promotormethylierungsstatus. Im Unterschied zum konstant bleibenden *MGMT* Promotormethylierungsstatus konnte eine Abnahme der Expression von MMR-Proteinen in Rezidiven festgestellt (Felsberg *et al.*, 2011) und gezeigt werden, dass die Therapie mit TMZ in Glioblastomrezidiven neue Mutationen in Genen des MMR-Systems, wie z.B. in *MSH6*, induziert und es somit zu erneutem Tumorwachstum und Fortschreiten der Erkrankung kommen kann (Agarwal *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2016). Eine Wiederherstellung von *MSH6* kann wiederum die TMZ-Empfindlichkeit erhöhen (Yip *et al.*, 2009), was dafür spricht, dass neben *MGMT* das MMR-System für die Wirkung von TMZ wichtig ist (Abb. 2).

1.2.3 Basenexzisionsreparatur

Die Basenexzisionsreparatur (BER) repariert die von TMZ methylierten Basen N7-MeG und N3-MeA, die zusammen ca. 85% aller durch TMZ alkylierten DNA-Addukte ergeben. Funktioniert BER nicht mehr, so sind diese Addukte zytotoxisch (Zhang *et al.*, 2012). Damit BER die methylierten Basen reparieren kann, ist es auf die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP) angewiesen. PARP ist ein nukleäres Enzym, welches dazu führt, dass ADP-Ribose Einheiten von PARP an die DNA, Histone und verschiedene Reparaturenzyme angehängt werden (Ratnam *et al.*, 2007). Inhibiert man PARP, so wird BER außer Kraft gesetzt. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass Glioblastomzellen, die ein defektes MMR-System aufweisen und damit TMZ-resistent sind, durch die Inhibierung von PARP wieder TMZ-sensitiv werden (Curtin *et al.*, 2004).

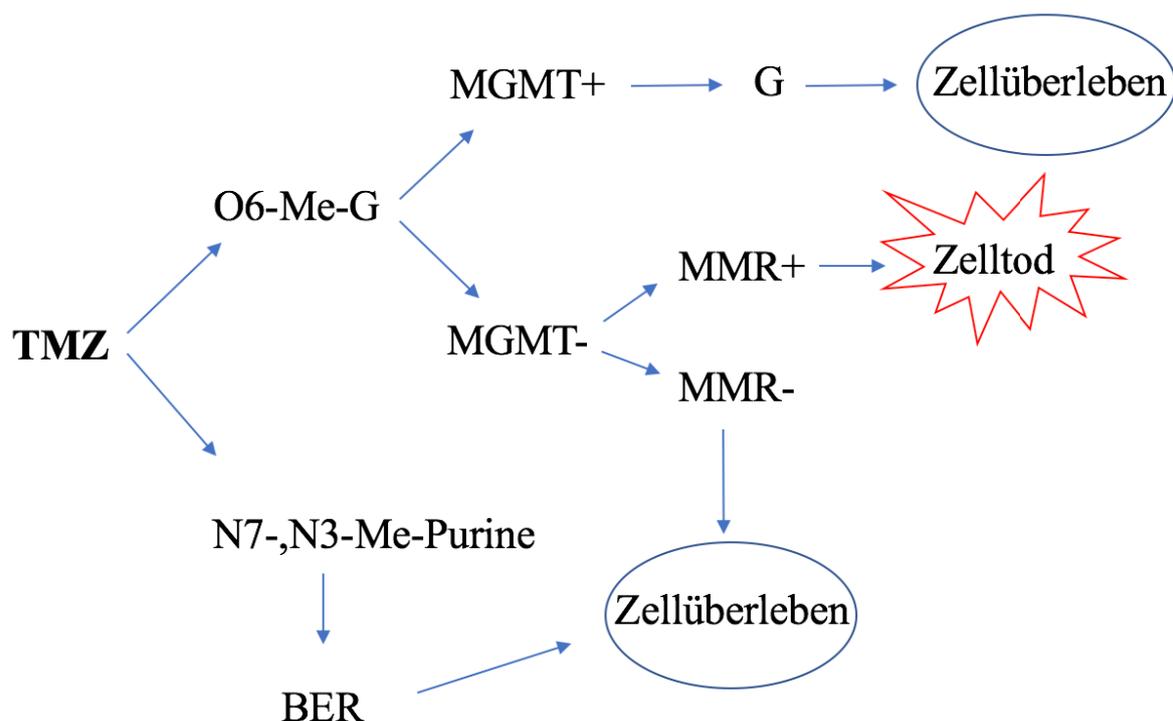


Abb. 2: Reparaturmechanismen, die Einfluss auf die Wirkung von TMZ nehmen (Zhang *et al.*, 2012). MGMT- bedeutet, dass MGMT durch eine Promotorhypermethylierung inaktiv ist. „+“ steht für aktiv, „-“, bedeutet inaktiv. MGMT+ bedeutet MGMT ist unmethyliert, befindet sich in seiner aktiven Form und kann die Methylgruppe von O6-Me-G (6-O-Methylguanosen) entfernen, wodurch „G“ (Guanosin) entsteht. MMR- bedeutet, dass das MMR-System defizient ist, was dazu führt, dass Zellen gegenüber TMZ resistent sind.

1.3 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) wurden im Jahr 1993 entdeckt und sind kleine nicht kodierende, einzelsträngige RNA Moleküle, die ungefähr 20-30 Nukleotide lang sind und die Expression von Genen auf der Ebene der mRNA Expression oder auf der Ebene der Translation regulieren (Orang *et al.*, 2014).

1.3.1 MicroRNA-Biogenese

Am Anfang der Biogenese einer miRNA steht die Synthese der primären-miRNA („*primary-miRNA*“, pri-miRNA). Die für die miRNA kodierenden Gene werden überwiegend durch das Enzym RNA Polymerase II, seltener durch die RNA-Polymerase III transkribiert (Lee *et al.*, 2004). MiRNA-Gene befinden sich auf allen Chromosomen, außer dem Y-Chromosom. Die

pri-miRNA hat am 5' Ende eine 7-Methylguanosin Kappe sowie am 3' Ende einen Poly(A)-Schwanz. Durch intramolekulare Basenpaarung entsteht aus der pri-miRNA eine Stem-Loop-Struktur. Das RNA-bindende Protein Pasha (DGCR8) stabilisiert im nächsten Schritt die pri-miRNA, sodass das Enzym Drosha (RNase III) die pri-miRNA zerschneiden und prozessieren kann, wodurch eine ca. 60 Nukleotide lange Vorläufer-miRNA („*precursor-miRNA*“, pre-miRNA) entsteht. Der Proteinkomplex aus Pasha und Drosha wird dabei als Mikroprozessorkomplex bezeichnet (Winter *et al.*, 2009). Durch das Enzym Exportin-5, welches auf den Cofaktor Ran-GTP angewiesen ist, wird die pre-miRNA aktiv aus dem Nucleus ausgeschleust (Yi *et al.*, 2003). Im Zytoplasma erfolgt die Herstellung des finalen doppelsträngigen, ungefähr 20 Nukleotide langen miRNA Moleküls durch das Enzym Dicer. Ein Strang der doppelsträngigen miRNA wird in den RNA-induzierten Silencing Complex (RISC) aufgenommen. Dieser setzt sich zusammen aus dem Enzym Dicer sowie dem Argonaut (Ago) Protein. Anders als bisher angenommen, degradiert der andere miRNA-Strang nicht, sondern übernimmt ebenfalls Zellfunktionen und kann Zielgene ansteuern (Bhayani *et al.*, 2012). Bindet die miRNA im RISC an das 3'-untranslatierte Ende der mRNA („*3'-untranslated region*, 3'-UTR“), so führt dies zur Destabilisierung der mRNA, zur Induktion der Inhibierung der Translation und zum Zerfall der mRNA durch das Ago Protein. Auf diesem Weg wird die Expression weiterer, von dieser mRNA abhängigen Proteine, unterbunden, die z.B. für Migration und Zellwachstum verantwortlich sein können (Winter *et al.*, 2009). Die Bindung am 3'-Ende zwischen der miRNA und der mRNA muss dabei nicht 100% komplementär sein. Für die Inhibierung der mRNA-Translation reicht es, wenn die Nukleotidsequenz der miRNA am 5'-Ende an Position 2 bis 8 („*seed region*“) komplementär zu den Nukleotiden am 3'-Ende der mRNA ist. Da bereits sieben komplementäre Basenpaare für eine ausreichende Bindung und Inhibierung reichen, kann eine miRNA zum Abbau von 100-200 verschiedenen mRNAs führen (Felekis *et al.*, 2010).

1.3.2 MicroRNAs in Gliomen

Die ersten Studien zu miRNAs in Gliomen erschienen im Jahr 2005. Ciafrè und Kollegen (2005) bestimmten mittels Microarray das Expressionslevel von 245 miRNAs in Glioblastomen von neun Patienten und verglichen es mit dem Expressionslevel im normalen Hirngewebe derselben Patienten. Dabei konnten sie insgesamt 13 miRNAs identifizieren, die zwischen Tumorgewebe und normalem Hirngewebe differenziell exprimiert waren. Zu den im Tumorgewebe schwächer exprimierten miRNAs gehören *miR-128a* und die *miR-181* Familie

(*miR-181a*, *miR-181b* und *miR-181c*). Zu den insgesamt neun miRNAs, die im Tumor höher exprimiert waren, zählten *miR-10b* und *miR-221* (Ciafrè *et al.*, 2005). Eine andere Studie, ebenfalls aus dem Jahr 2005, untersuchte *miR-21* und konnte zeigen, dass eine Inhibierung der *miR-21* mit einer erhöhten Apoptoserate von Glioblastomzellen einhergeht. *MiR-21* wurde damit als Onkomir klassifiziert (Chan *et al.*, 2005). Seitdem wurde *miR-21* in sehr vielen Studien intensiv untersucht. Studien in Glioblastom-Mausmodellen, in denen *miR-21* inhibiert wurde, zeigten, dass Proliferation und Tumorwachstum zurückgehen (Corsten *et al.*, 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung der *miR-21* mit einer antiproliferativen und proapoptotischen Wirkung in den Glioblastomzelllinien U251MG und U87MG einhergeht (Qian *et al.*, 2012). *Vice versa* führt eine Überexpression von *miR-21* zu einer Inhibierung des proapoptotischen Proteins BAX und gleichzeitig zu einer Überexpression vom antiapoptotischen Protein BCL2 und damit zu einer TMZ-Resistenz (Shi *et al.*, 2010). In weiteren Studien zu miRNAs in Glioblastomen konnten insgesamt mehr als 250 deregulierte miRNAs identifiziert werden, die in Tumorzellen entweder unter- oder überexprimiert sind und die Einfluss auf die Proliferation (wie z.B. *miR-9*, *miR-15b*), Invasion (wie z.B. *miR-10b*, *miR-21*), Angiogenese (wie z.B. *miR-20a*, *miR-30e* und *miR-93*), Wachstum (wie z.B. *miR-17*, *miR-18a*, *miR-20a*) und Apoptose (wie z.B. *miR-125b* und *miR-221*) haben (Møller *et al.*, 2013).

1.3.3 MicroRNAs im Zusammenhang mit TMZ-Resistenz

Neuere Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen deregulierter miRNA Expression und Resistenz gegenüber TMZ im Glioblastom. In *in vitro* Studien konnten miRNAs identifiziert werden, die MGMT regulieren, wie z.B. *miR-370-3p* und *miR-603*, und dadurch die Sensitivität gegenüber TMZ wiederherstellen können (Gao *et al.*, 2016). *MiR-29c* ist im Tumorgewebe von Patienten mit primären Glioblastomen herunterreguliert und eine Überexpression führt über die Inhibierung des Transkriptionsfaktors SP1 (Specificity Protein 1) zu einer verringerten MGMT-Promotoraktivität. Dies resultiert im besseren Ansprechen der Tumorzellen auf TMZ sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Xiao *et al.*, 2016). Wird *miR-182* direkt in experimentelle Gliome in Mäusen injiziert, führt dies zu einer erhöhten TMZ-Sensitivität, Verringerung des Tumorwachstums und Verlängerung der Überlebensdauer (Kouri *et al.*, 2015). Eine Inhibierung der *miR-221* erhöht die TMZ-Sensitivität und Apoptoserate in der TMZ-resistenten Glioblastomzelllinie T98G (Bertucci *et al.*, 2015).

Peptid-Nukleinsäuren („*peptide nucleic acid*“, PNAs) sind organische Polymere, die über eine hohe Affinität für komplementäre DNA- oder RNA-Moleküle verfügen und miRNAs

herunterregulieren können (Bertucci *et al.*, 2015). Durch anti-miR-221 PNA-Octaarginin-Konjugate (R8-PNA221) konnte *miR-221 in vivo* herunterreguliert werden. Durch den Einsatz von Nanopartikeln („*Mesoporous Silica*“) wurde R8-PNA221 zusammen mit TMZ verabreicht und führte zu einer Sensitivitätszunahme der resistenten Zellen (Bertucci *et al.*, 2015). In einer anderen Studie wurden PNA-Octaarginin-Konjugate, die gegen *miR-221* und *miR-222* gerichtet sind, co-administriert. Dabei konnte eine Zunahme der Apoptoseaktivität in TMZ-resistenten T98G Zellen beobachtet werden (Brognara *et al.*, 2015). Demgegenüber wurde gezeigt, dass *miR-16* die Resistenz gegenüber TMZ erhöht, in dem es in der Zelllinie U251MG das Protein BCL2 hochreguliert (Han *et al.*, 2015).

In neueren Studien wurden weitere miRNAs identifiziert, die das Ansprechen auf TMZ modulieren: eine Überexpression der miRNAs *miR-210*, *miR-203*, *miR-146a*, *miR-136*, *miR-128*, *miR-149*, *miR-181a-d* (Lee *et al.* 2015; Tang *et al.* 2014; Chen *et al.* 2017; Wu *et al.* 2015; Wu *et al.* 2014; She *et al.* 2014) sowie eine verminderte Expression der miRNAs *miR-20a*, *miR-381*, *miR-125b*, *miR-497* (Haemmig *et al.*, 2014; Lan *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2017) erhöhen die TMZ-Sensitivität von Gliomzellen. Die Überexpression von *miR-31* erhöht zudem die Zytotoxizität durch TMZ (Zhou *et al.*, 2015).

Die große Anzahl der Studien und Veröffentlichungen innerhalb kurzer Zeit ist ein Hinweis darauf, wie brisant das Thema ist. Zu Beginn der Forschungsarbeiten zu dieser Dissertationsschrift im Mai 2011 gab es zu dem Thema miRNAs, die TMZ-Sensitivität in Glioblastomzelllinien beeinflussen, lediglich zwei Publikationen: die Studie von Shi *et al.* (2010) hat *miR-21* als Oncomir identifiziert, die die Resistenz gegenüber TMZ in der Zelllinie U87MG durch eine induzierte Apoptose und Verringerung von BAX/BCL2 erhöht. Die Studie von Ujifuku *et al.* (2010) hat *miR-195*, *miR-455-3p* und *miR-10a* als miRNAs identifiziert, die das Ansprechen auf TMZ beeinflussen. Beide Studien untersuchten deregulierte miRNAs in Glioblastomzelllinien, nicht jedoch im Tumorgewebe von Patienten mit Primär- und Rezidivtumor nach TMZ-Behandlung.

1.4 Arbeitsziele

Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von Chemotherapieresistenz-assoziierten microRNAs in Gliomzellen. Dabei sollen folgende Fragen beantwortet werden: 1. Welche miRNAs werden in Temozolomid (TMZ)-resistenten im Vergleich zu TMZ-sensitiven Gliomzellen *in vitro* differenziell exprimiert? 2. Welche dieser identifizierten miRNAs wird in gepaarten Gewebeproben aus Primär- und Rezidivglioblastomen nach TMZ-Behandlung des Patienten differenziell exprimiert? 3. Welchen Effekt hat eine Modulation der Expression ausgewählter differenziell exprimierter miRNAs auf die TMZ-Sensitivität von Gliomzellen?

2 Material

2.1 Laborgeräte

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

Tabelle 1: Laborgeräte

| Hersteller | Gerät / Version |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Applied Biosystems, Foster City, CA | Real time PCR StepOnePlus™ 7900 HAT System |
| Biometra GmbH, Göttingen | PCR Thermocycler T3000 |
| 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 |
| Hettich GmbH, Tuttlingen | Zentrifuge 46R Kühlzentrifuge EBA 12R |
| Janke & Kunkel (IKA) | Ultraturrax T25 |
| PeqLab GmbH, Erlangen | Gel Kammern für Agarosegele Photometer NanoDrop ND-1000 |
| Sartorius AG, Göttingen | Digitale Waage ALC |
| Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland | Infinite® 200 PRO multimode microplate reader |
| VELP Scientifica, Usmate, Italy | Vortexer Zx3 |

2.2 Software

Für die Datenanalyse der quantitativen PCR-Experimente wurde das Programm StepOne™ Software v2.0 benutzt. Für statistische Analysen wurde das Programm GraphPad Prism 5 benutzt. Zur Erstellung von Text, Tabellen und Abbildungen der vorliegenden Arbeit wurden das Microsoft Office 2016 Paket (MS Word, MS Excel und MS PowerPoint) und Adobe

Photoshop CS6 eingesetzt. Die Literaturverwaltung und Erstellung des Literaturverzeichnisses erfolgte mit dem Programm Mendeley.

2.3 Reagenzien, Chemikalien und Kits

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Reagenzien, Chemikalien und sonstigen Verbrauchsmaterialien, die bei den Experimenten zum Einsatz kamen. In vielen Experimenten wurden käuflich erhältliche Kits verwendet. Falls nicht anders beschrieben, wurden die Experimente den Protokollen der Herstellerangaben folgend durchgeführt.

Tabelle 2: Reagenzien und Chemikalien

| Hersteller | Reagenzien, Chemikalien, Materialien |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Affymetrix, Santa Clara, CA | Affymetrix® FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit GeneChip® miRNA 2.0 Array |
| Ambion, Huntington, UK | FirstChoice™ Human Brain total RNA (AM 7962) |
| Applied Biosystems, Invitrogen, Life Technologies (ThermoFisher Scientific), Waltham, Massachusetts | TaqMan™ MicroRNA Assay TaqMan® Universal PCR Master Mix <i>U6 snRNA</i> (Assay ID: #001973) <i>hsa-miR-138-5p</i> (Assay ID: #002284) <i>hsa-miR-195-5p</i> (Assay ID: #000494) TaqMan™ MicroRNA-cDNA-Synthese-Kit TRIzol™ Reagent (15596018) SYBR® Green Lipofectamine 2000 transfection reagent Opti-MEM reduced serum medium Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) Fetal calf serum (FCS) Glutamin Gibco™ Trypan Blue Solution, 0.4% |
| Bio-Budget GmbH, Krefeld | Agarose (10-35-1020) DNA Marker 100 bp (85-2000-250) |

DNA Marker 1 kilo bp (85-1000-250)

Dharmacon GE Healthcare, Lafayette, CO

miRIDIAN *miR-138* (hsa-miR-138-5p) mimic (C-300606-05) and Hairpin Inhibitor (IH-300605-06)

miRIDIAN *miR-192* (hsa-miR-192-5p) mimic (C-300528-03)

miRIDIAN microRNA mimic Negative Control #1 (CN-001000-01)

miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor Negative Control #1 (IN-001005-01)

miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor Transfection Control with Dy547 (IP-004500-01)

BioCat GmbH, Heidelberg

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)

| | |
|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf | Midori Green Advance (617004) |
| Macherey-Nagel AG, Oensingen, Switzerland | NucleoSpin® RNA |
| Merck KGaA, Darmstadt | Essigsäure (1.00063) Tris-Base (2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol) Kristallviolett (101408) |
| PAA GmbH, Pasching | Trypsin EDTA (L11-004) |
| Qiagen (Exiqon), Hilden | miRNeasy Mini Kit (74104) miRCURY LNA™ Universal RT microRNA hsa-miR-138-5p, LNT™ PCR-Primer Set, Uni RT (206078) hsa-miR-192-5p, LNT™ PCR-Primer Set, Uni RT (204099) hsa-miR-9-5p, LNT™ PCR-Primer Set, Uni RT (204513) hsa-miR-181d-5p, LNT™ PCR-Primer Set, Uni RT (204789) hsa-miR-185-5p, LNT™ PCR-Primer Set, Uni RT (206037) hsa-miR-194-5p, LNT™ PCR-Primer Set, Uni RT (204080) hsa-miR-497-5p, LNT™ PCR-Primer Set, Uni RT (204354) hsa-miR-195-5p, LNT™ PCR-Primer Set, Uni RT (205869) hsa-miR-29a-5p, LNT™ PCR-Primer Set, Uni RT (204430) hsa-miR-939-5p, LNT™ PCR-Primer Set, Uni RT (2114332) Universal cDNA-Synthese-Kit (203300) U6 snRNA (hsa, mmu, mo) PCR-Primer Set, Uni RT (203907) |
| Schering-Plough, Kenilworth, USA | Temozolomid (Bestellnummer nicht bekannt) |

Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Bromphenolblau (B3269-5ML)
 EDTA (E5134)
 Xylencyanol Blau (X-4126)
 DMSO (D5879)

Stratagene, Zürich, CH

MVP Total RNA, Human Brain (540005)
 Universal human Reference RNA (740000)

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Lösung, die bei den Experimenten zum Einsatz kam.

Tabelle 3: Lösung

| Name | Zusammensetzung |
|-------------------------|---------------------------------------------------------|
| TAE Puffer (50x) | 2 M Tris-Base 1 M Essigsäure 50 mM EDTA pH 8,0 |

2.4 Gewebeproben von Glioblastom-Patienten

Die Tumorgewebeproben von 10 Patienten mit primären, unbehandelten Glioblastomen und Rezidivtumoren nach der TMZ-Behandlung entstammten der ZNS-Tumorgewebekbank am Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Teile des neurochirurgisch entnommenen Tumorgewebes wurden nach der Operation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Die Verwendung der Gewebeproben für Forschungsarbeiten im Rahmen dieses Promotionsprojektes wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter den Studien-Nummer 3825, 3562, 2767 und 3608 genehmigt und erfolgte in pseudonymisierter Form. Die Tumoren wurden zum Zeitpunkt der durchgeführten Versuche anhand der damals gültigen WHO („*World Health Organization*“)-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems als Glioblastome, WHO-Grad IV eingestuft (Louis *et al.*, 2007). Der

Tumorzellgehalt jeder einzelnen Probe, die in dieser Arbeit untersucht wurde, lag bei mindestens 80%. Alle Tumoren wiesen keine IDH-Mutationen auf, entsprachen als Glioblastomen, IDH-Wildtyp, WHO-Grad IV gemäß der aktuell gültigen WHO-Klassifikation 2016 (Louis *et al.*, 2016).

2.5 Glioblastomzellen und Kulturbedingungen

Für die Untersuchung von miRNA Expression und Funktion in Gliomzellen wurden drei etablierte Gliomzelllinien (LN-18, LNT-229, LN-308) verwendet. Neben den parentalen, TMZ-sensitiven Zelllinien wurden daraus abgeleitete TMZ-resistente Zelllinien verwendet, die von Frau Dr. Caroline Hertler, geb. Happold, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Michael Weller, Klinik für Neurologie, Universitätsspital Zürich, repetitiv über mehrere Monate mit steigenden TMZ Konzentrationen behandelt worden waren, bis ein resistenter Phänotyp erreicht werden konnte (Happold *et al.*, 2012). Die Zellen wurden standardisiert alle 2 Wochen für 24 Stunden mit TMZ behandelt. Die TMZ-Konzentrationen wurden über 6 Monate gesteigert. Zellen, die 24 Stunden nach TMZ Behandlung vital waren, d.h. Kolonien bilden konnten, wurden für weitere TMZ Behandlungen selektiert. Resistente Sublinien der Zelllinie LN-18 (LN-18_R) haben durch die repetitive TMZ-Gabe die Expression von MGMT hochreguliert und weisen im Vergleich zu den parentalen LN-18 Zellen (LN-18_P) eine noch geringere TMZ-Sensitivität auf. Der IC50-Wert im Kolonieüberlebenstest war in den resistenten Zellen bis zu 10 mal höher, verglichen mit den parentalen Zellen. Die LNT-229 Zelllinie exprimiert kein MGMT. Durch die repetitive TMZ-Gabe hat sich auch hier ein resistenter Phänotyp entwickelt (LNT-229_R), in dem im Vergleich zu den parentalen LNT-229 Zellen (LNT-229_P) die MMR-Proteine herunterreguliert sind. In der Zelllinie LN-308 konnte ebenfalls eine TMZ-Resistenz (LN-308_R) erreicht werden, jedoch ist der Mechanismus, der zur Resistenz führt, bisher ungeklärt (Happold *et al.*, 2012).

Die Zelllinien wurden im *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), welches 10% fetales Kälberserum (FCS) und 2 mM Glutamin enthält, kultiviert. TMZ wurde in 100 mM Lösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst und die Aliquots bei -20°C gelagert.

2.6 Sequenzen der MicroRNAs

Tabelle 4 zeigt die Auflistung der miRNA Sequenzen, MIMAT-Nummern sowie die jeweilige Bestellnummer der Echtzeit-PCR Primer.

Tabelle 4: miRNA Sequenzen

| Name der miRNA Firma | MIMAT-Nr. Bestellnummer | Sequenz der miRNA Link zu mirbase.org |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>hsa-miR-138-5p</i> Exiqon Applied Biosystems | MIMAT0000430 Cat. No: 206078 Assay ID: #002284 | AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG (http://www.mirbase.org/cgi-bin/get_seq.pl?acc=MIMAT0000430 ; 21.01.2017) |
| <i>hsa-miR-192-5p</i> Exiqon | MIMAT0000222 Cat. No: 204099 | CUGACCUAUGAAUUGACAGCC (http://www.mirbase.org/cgi-bin/get_seq.pl?acc=MIMAT0000222 ; 21.01.2017) |
| <i>hsa-miR-9-5p</i> Exiqon | MIMAT0000441 Cat. No: 204513 | UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA (http://www.mirbase.org/cgi-bin/get_seq.pl?acc=MIMAT0000441 ; 21.01.2017) |
| <i>hsa-miR-181d-5p</i> Exiqon | MIMAT0002821 Cat. No: 204789 | AACAUUCAUUGUUGUCGGUGGGU (http://www.mirbase.org/cgi-bin/get_seq.pl?acc=MIMAT0002821 ; 21.01.2017) |
| <i>hsa-miR-185-5p</i> Exiqon | MIMAT0000455 Cat. No: 206037 | UGGAGAGAAAGGCAGUUCCUGA (http://www.mirbase.org/cgi-bin/get_seq.pl?acc=MIMAT0000455 ; 21.01.2017) |
| <i>hsa-miR-194-5p</i> Exiqon | MIMAT0000460 Cat. No: 204080 | UGU AACAGCAACUCCAUGUGGA (http://www.mirbase.org/cgi-bin/get_seq.pl?acc=MIMAT0000460 ; 21.01.2017) |
| <i>hsa-miR-497-5p</i> Exiqon | MIMAT0002820 Cat. No: 204354 | CAGCAGCACACUGUGGUUUGU (http://www.mirbase.org/cgi-bin/get_seq.pl?acc=MIMAT0002820 ; 21.01.2017) |

| | | |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>hsa-miR-195-5p</i> Exiqon Applied Biosystems | MIMAT0000461 Cat. No: 205869 Assay ID: #000494 | UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC (http://www.mirbase.org/cgi-bin/get_seq.pl?acc=MIMAT0000461 ; 21.01.2017) |
| <i>hsa-miR-29a-5p</i> Exiqon | MIMAT0004503 Cat. No: 204430 | ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAG (http://www.mirbase.org/cgi-bin/get_seq.pl?acc=MIMAT0004503 ; 21.01.2017) |
| <i>hsa-miR-939-5p</i> Exiqon | MIMAT0004982 Cat. No: 2114332 | UGGGGAGCUGAGGCUCUGGGGGUG (http://www.mirbase.org/cgi-bin/get_seq.pl?acc=MIMAT0004982 ; 21.01.2017) |
| <i>hsa-miR-3131</i> Exiqon | MIMAT0014996 Cat. No: 2105160 | UCGAGGACUGGUGGAAGGGCCUU (http://www.mirbase.org/cgi-bin/get_seq.pl?acc=MIMAT0014996 ; 21.01.2017) |

3 Methoden

3.1 Microarray-basierte miRNA-Expressionsanalyse

Für die Microarrayanalysen wurden 400 ng RNA mittels Affymetrix® FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit mit Biotin-markiert und anschließend auf den GeneChip® miRNA 2.0 Arrays hybridisiert. Durch die Hybridisierung konnte die Expression von über 1100 miRNAs gleichzeitig untersucht werden. Die Hybridisierungen der Affymetrix Chips erfolgte am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Verwendung des *GeneChip® Hybridization Oven 645* und des *GeneChip® Scanner 3000 7G*.

3.2 Bioinformatische und statistische Analyse der Microarray-basierten Expressionsdaten

Die bioinformatische Analyse der Microarraydaten erfolgte durch Herrn Dr. Steffen Sass aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Fabian Theis vom Helmholtz-Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt. Die Expressionsdaten wurden normalisiert und log₂-transformiert mittels der RMA („*robust multi-array average*“)-Methode, die Bestandteil des Affymetrix Software-Pakets ist (Gautier *et al.*, 2004). Die differenzielle Expression zwischen den parental und resistenten Zelllinien wurde mit Hilfe des Limma-Pakets untersucht (Smyth *et al.*, 2005). Eine miRNA wurde als differenziell exprimiert gewertet, wenn der Expressionsunterschied („*Fold change*“, Fc) größer 1,5 und der p-Wert kleiner 0,05 war (vgl. Stojcheva *et al.*, 2016).

3.3 Bestimmung des miRNA-Expressionsniveaus mittels quantitativer Echtzeit-PCR

3.3.1 RNA Extraktion aus Zellen und Hirntumorgewebe

Die RNA aus den drei parental und resistenten Glioblastomzelllinien sowie aus den 10 Tumorgewebeproben bestehend aus Primär- und Rezidivtumoren wurde mit dem

TRIzol™ Reagent gemäß Herstellerangaben extrahiert. Anschließend wurde das RNA-Pellet in 15 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die RNA-Konzentration wurde mittels des NanoDrop ND-1000 Photometers bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Qualität der RNA wurde überprüft, in dem 1 µg RNA auf ein 1%-Agarosegel aufgetrennt wurde. Die miRNA wurde mit Hilfe des miRNeasy Mini Kits extrahiert.

3.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) und quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode, um bestimmte DNA-Sequenzen zu vervielfältigen. Der Ablauf besteht aus 25-50 Zyklen und lässt sich in drei sich bei jedem Zyklus wiederholende Phasen einteilen: 1. Denaturierung der Doppelhelix, 2. Primer Hybridisierung, um den Ziel-Abschnitt einzugrenzen und 3. Elongation und Amplifikation, um den Ziel-Abschnitt zu vervielfältigen. Die quantitative Echtzeit („*real-time*“-)PCR (qPCR) ist eine Erweiterung der klassischen PCR. Während des qPCR-Laufs wird durch die Zugabe eines Farbstoffs, der in die DNA-Doppelhelix interkaliert und nach Anregung mit UV-Licht fluoresziert, die Fluoreszenzzunahme mit einer Kamera aufgenommen und anschließend ausgewertet. Die Fluoreszenzintensität steigt mit den amplifizierten PCR-Produkten an und kann in Echtzeit nach jedem Zyklus gemessen werden. Dies erlaubt Rückschlüsse auf die relative Expression der Ziel-mRNA in den jeweiligen Zelllinien und Tumorproben. Die semiquantitative Bestimmung der Produktmenge erfolgt in der exponentiellen Phase der Reaktion, da nur in dieser Phase alle Reagenzien in ausreichender Menge vorliegen.

3.3.3 Das Prinzip der quantitativen Echtzeit PCR (qPCR) mit SYBR®Green oder TaqMan®-Sonde

In dieser Arbeit wurde mit zwei verschiedenen Fluoreszenz-Detektionsmethoden gearbeitet: mit dem interkalierende Farbstoff SYBR®Green sowie mit TaqMan®-Sonden. Der DNA-interkalierende Cyanin-Farbstoff SYBR®Green (Abb. 3) lagert sich unspezifisch in doppelsträngige DNA ein. Während der qPCR entstehen mit jedem Zyklus mehr Amplikons und die Fluoreszenz nimmt proportional zur Menge des PCR-Produkts zu. Am Ende der Elongation findet in jedem Zyklus die Messung der Fluoreszenz statt. Der Vorteil durch den unspezifischen Einbau von SYBR®Green ist die universelle Verwendbarkeit. Im Vergleich zur Detektion des Amplifikationsproduktes mit einer TaqMan®-Sonde ist keine sequenzspezifische

Sonde erforderlich. Der Nachteil ist, dass es keine spezifische Bindung mit der Ziel-DNA gibt, d.h. es entsteht auch ein Fluoreszenzanstieg, wenn SYBR[®]Green an Primerdimere oder Artefakte bindet. Daher ist es wichtig, eine Schmelzkurven-Analyse an die qPCR anzuschließen, um sicherzustellen, dass das gewünschte Amplikon detektiert wurde.

Bei der Schmelzkurven-Analyse erfolgt durch schrittweisen Temperaturanstieg die Auftrennung von Duplexen. Der Knickpunkt in der Schmelzkurve stellt dabei die spezifische Temperatur dar, bei der 50% der Duplexe einzelsträngig vorliegen. Diese Temperatur ist von der Länge und der Basenzusammensetzung des Amplikons abhängig und sollte für die generierten PCR-Produkte der untersuchten Proben gleich sein.

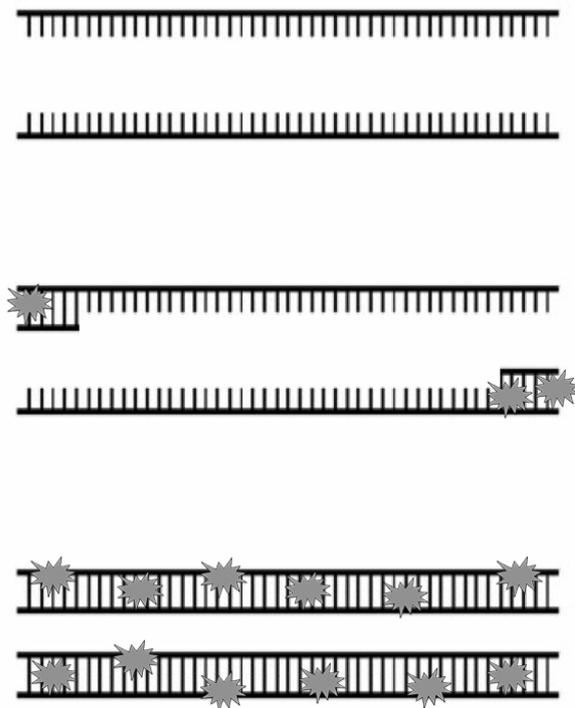


Abb. 3: Das Prinzip von SYBR[®]Green (Abbildung angelehnt an Botes *et al.*, 2013). SYBR[®]Green interkaliert unspezifisch in doppelsträngige DNA-Sequenzen. Während der PCR wird ein durch die verwendeten Primer begrenzter Bereich amplifiziert, SYBR[®]Green kann sich in die entstandenen doppelsträngigen DNA-Moleküle einlagern und fluoresziert nach entsprechender Anregung mit UV-Licht (sternförmig in grau angedeutet).

Das Prinzip der TaqMan[®]-Sonde wird in der Abb. 4 dargestellt. Anders als bei SYBR[®]Green, welches unspezifisch in doppelsträngige DNA interkaliert, kommt es beim TaqMan[®]-Sondenprinzip erst dann zur Fluoreszenz, wenn 1. die Primer spezifisch an die gewünschte Ziel-DNA gebunden haben, da von diesen ausgehend die DNA Polymerase mit der Strangsynthese

startet und 2. die TaqMan[®]-Sonde spezifisch an die gewünschte Ziel-Sequenz gebunden hat, da diese von der *Taq*-DNA-Polymerase entlang der Synthese aufgespalten wird. Die *Taq*-DNA-Polymerase ist für die Synthese des neuen DNA-Stranges verantwortlich. Während der Synthese stößt sie auf die sequenzspezifische TaqMan[®]-Sonde und setzt ihre 5'-3' Exonukleaseaktivität ein. Dadurch wird die Sonde in 5'-Monophosphate gespalten, welche nicht mehr an den DNA-Strang binden können und von diesem abfallen. Dadurch wird der Reporter vom Quencher in seiner Aktivität nicht mehr unterdrückt und kann zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Intensität der Fluoreszenz steigt proportional zur Menge des Amplikons, also dem Bereich, der amplifiziert wird, an. Wird ein Zielgen nicht exprimiert, dann erfolgt keine Bindung der Primer und der TaqMan[®]-Sonde und es entsteht kein Fluoreszenzsignal. Die Detektion des Zielgens erfolgt bei diesem Prinzip spezifischer. Anders als bei SYBR[®]Green kann beim TaqMan[®]-Sondenprinzip keine Schmelzkurven-Analyse nach dem PCR-Lauf erfolgen, weshalb die Spezifität der TaqMan[®]-Sondenbindung mittels einer Gelelektrophorese überprüft werden sollte. Dabei wird das PCR Produkt auf das Agarosegel aufgetragen und die Größe des Amplikons bestimmt.

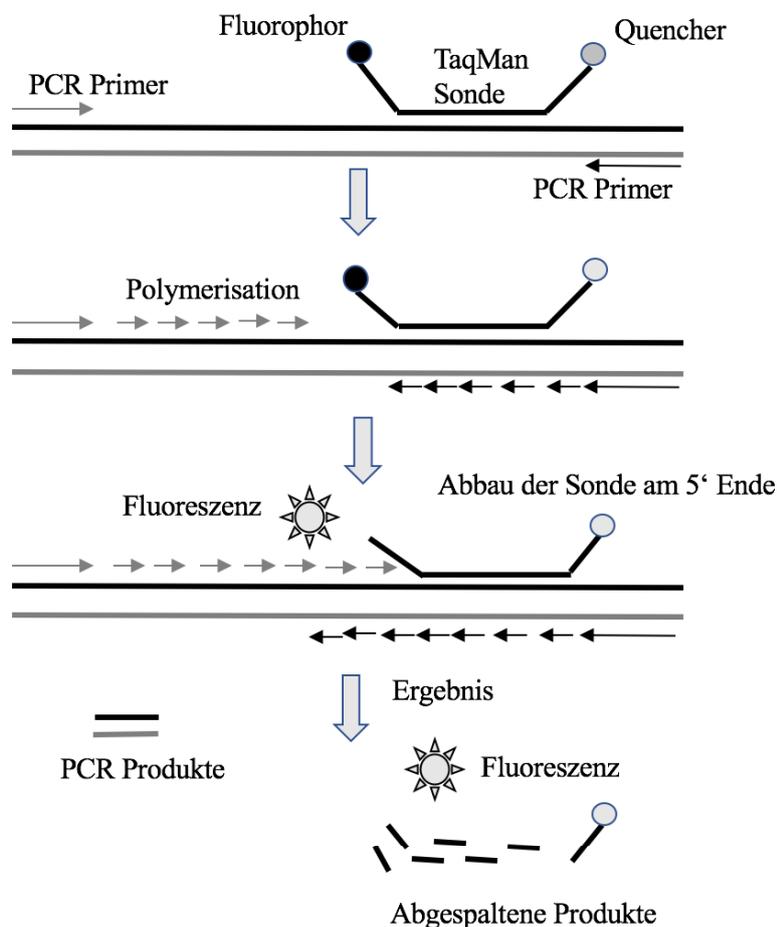


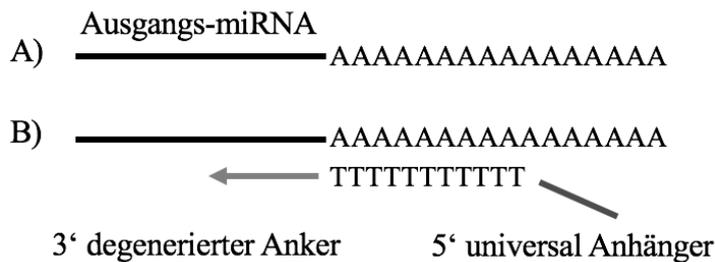
Abb. 4: Das Prinzip der quantitativen PCR mittels TaqMan[®]-Sonden (Abbildung angelehnt an Botes *et al.*, 2013). Die Sonde trägt am 3' Ende einen Quencher und an ihrem 5' Ende einem fluoreszierenden Reporter (Fluorophor). Der Quencher unterdrückt den Reporter in seiner Fluoreszenz. Sobald die doppelsträngige DNA bei der Amplifizierung in zwei Einzelsträngen vorliegt, bindet die Sonde spezifisch an die Ziel-DNA. Während die Taq-Polymerase den DNA-Strang synthetisiert und im Verlauf der Synthese auf die an der DNA gebundene Sonde trifft, wird diese an ihrem 5' Ende abgebaut und der Abstand zwischen Reporter und Quencher vergrößert sich. Der Reporter wird nun nicht mehr vom Quencher in seinem Fluoreszenzsignal unterdrückt und kann zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt durch das qPCR-Gerät am Ende der Elongation nach jedem Zyklus (Botes *et al.*, 2013).

3.3.4 cDNA-Erststrangsynthese und Echtzeit-PCR nach dem miRCURY LNA[™] Universal RT microRNA PCR-System

Das miRCURY LNA[™] Universal RT microRNA PCR-System (Exiqon-System), ist ein miRNA-spezifisches System, welches entwickelt wurde, um die Expression von miRNAs mittels Echtzeit-PCR (qPCR) zu detektieren. Zunächst wird ein Poly(A)-Schwanz an die reife miRNA angefügt (Abb. 5, Step 1A). Anschließend erfolgt die Ligation des Poly(T)-Primers an die reife miRNA. Die Erststrangsynthese erfolgt mit Hilfe der Reversen Transkriptase. Im Anschluß an die cDNA-Synthese erfolgt zur Detektion der Expression bestimmter miRNAs die Echtzeit-PCR mit LNA[™] verstärkten, miRNA-spezifischen Primern sowie SYBR[®]Green. LNA steht für „*locked nucleic acid*“, ein modifiziertes RNA-Nukleotid. Dieses hat eine Brücke am 4'-Kohlenstoffatom sowie dem 2'-Sauerstoffatom. Dadurch ist das RNA-Nukleotid strukturell im Vergleich zu einem unmodifizierten Analogon unflexibler, bindet stärker an das jeweilige Zielmolekül und hat einen höheren Schmelzpunkt. MiRNAs mit geringem Expressionsniveau können dadurch besser detektiert werden.

Das besondere an dem Exiqon-System ist die Tatsache, dass mit einer synthetisierten cDNA, alle relevanten miRNAs während des qPCR-Laufs detektiert werden können. Dadurch kann viel von der Ausgangs-RNA eingespart werden. Im Vergleich dazu, erfolgt bei der cDNA-Synthese-Methode von Applied Biosystems für jede zu untersuchende miRNA eine eigene cDNA-Synthese mit miRNA-spezifischen Stem-Loop-Primern. Dies führt zu höherem Materialeinsatz und Kosten. Ein Nachteil des Exiqon-Systems ist, dass die synthetisierte cDNA laut Herstellerangaben nur 14 Tage haltbar ist.

Schritt 1: Erststrangsynthese



Schritt 2: qPCR Amplifikation



Abb. 5: cDNA-Synthese und quantitative Echtzeit-PCR mit dem Exiqon-System (Abbildung angelehnt an Exiqon: Instruction manual, Version 4.1 #203300 (August 2011)). Zunächst wird an die Ausgangs-miRNA ein Poly-A-Schwanz angefügt (1A). Die cDNA-Synthese erfolgt, indem ein Poly-T-Primer mit einem degenerierten Anker am 3'-Ende und einem Universal-Anhänger am 5'-Ende an den Poly-A-Schwanz bindet (1B). Anschließend wird während der qPCR die cDNA mittels miRNA-spezifischen LNA[™] Vorwärts- und Rückwärtsprimern amplifiziert (2A). SYBR[®]Green wird als Farbstoff für die Detektion benutzt (2B).

Für die cDNA-Synthese wurde zunächst die Gesamt-RNA mit RNase-freiem H₂O auf 50 ng/μl verdünnt. Anschließend wurden 4 μl von der verdünnten RNA zum Reaktionsmix (Tabelle 5) dazugegeben, sodass sich ein Gesamtvolumen von 20 μl pro Reaktionsansatz ergab.

Tabelle 5: Reaktionsmix cDNA-Synthese mit dem Universal cDNA Synthesis Kit II (Exiqon-System)

| | |
|-------------------------------|-------|
| 5x Reaktionspuffer (Exiqon) | 4 μl |
| RNase-freies H ₂ O | 10 μl |
| Enzym-Mix (Exiqon) | 2 μl |
| Verdünnte Proben-RNA | 4 μl |
| gesamt | 20 μl |

Der Reaktionsmix aus Tabelle 5 wurde in eine 96-Well Platte pipettiert. Diese wurde vorher so zugeschnitten, dass sie in den T3000 Thermocycler (Biometra[®]) hineinpasst. Anschließend

wurde die Platte verschlossen, für 60 min im Thermocycler bei 42°C inkubiert und danach auf 95°C für 5 min erhitzt, um das Enzym Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Zum Schluß wurde das fertige cDNA-Produkt sofort auf 4°C runtergekühlt und im Gefrierschrank bei -20°C gelagert. Für die sich anschließende qPCR wurde die cDNA mit RNase-freiem H₂O im Verhältnis Probe zu Wasser auf 1:38 verdünnt.

Im nächsten Schritt wurde die cDNA mit dem Farbstoff SYBR®Green und den miRNA-spezifischen LNA™ PCR-Primerset zusammengebracht (Tabelle 6). Spezifische LNA™ PCR-Primersets bestehend aus Vorwärts- und Rückwärtsprimer wurden in jeweils 110 µl RNase-freies H₂O resuspendiert, anschließend zusammenpipettiert und 25 min auf Eis ruhen gelassen bevor der Reaktionsmix (Tabelle 6) erstellt wurde.

Tabelle 6: Reaktionsmix für die qPCR

| | |
|------------------------|-------|
| SYBR® Green Master Mix | 5 µl |
| LNA™ PCR Primer Mix | 1 µl |
| Verdünnte Proben-cDNA | 4 µl |
| gesamt | 10 µl |

Der Reaktionsmix wurde in die Probestaschen einer 96-Well Platte pipettiert, mit einem MicroAmp™ Optical Adhesive Film versehen und anschließend herunterzentrifugiert. Das Echtzeit-PCR Gerät StepOnePlus™ von Applied Biosystems wurde für die Durchführung der qPCR entsprechend der Tabelle 7 konfiguriert.

Tabelle 7: qPCR-Programm für die qPCR

| | |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aktivierung der <i>Taq</i> DNA Polymerase | 90° C für 10 min |
| 40 Amplifikationszyklen mit jeweils Erhitzung auf | 95° C für 15 sec (Denaturierung des DNA-Doppelstranges) 60° C für 1 min (Anlagerung der Primer und DNA Synthese) |

3.3.5 cDNA-Erststrangsynthese und qPCR nach dem TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription System

Der Prozess der cDNA-Synthese mit dem TaqMan® Small RNA Assay (Applied Biosystems) beginnt mit der Anlagerung des miRNA-spezifischen Stem-Loop Primers („*looped RT primer*“)

und der Synthese des komplementären Stranges vom 5' zum 3' Ende (siehe Abb. 6). Die miRNAs sind kurze, einzelsträngige Moleküle, sodass ein spezifischer Stem-Loop Primer benötigt wird, damit die Polymerasen binden und die cDNA-Synthese erfolgen kann.

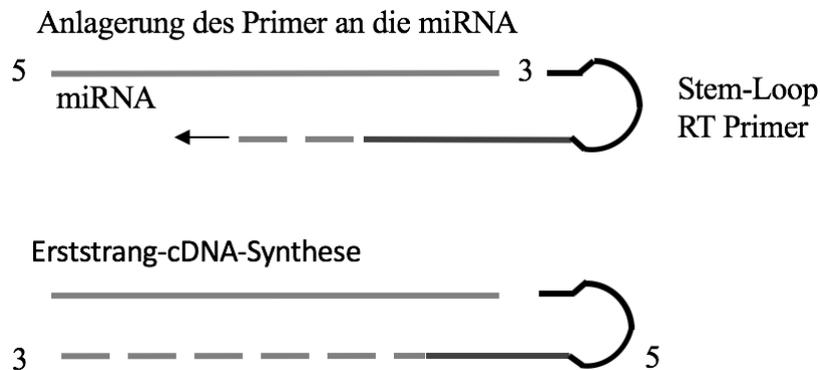


Abb. 6: Reverse Transkription (cDNA-Synthese) mit dem TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription System von Applied Biosystems. Der miRNA-spezifische Stem-Loop RT-Primer lagert sich an die miRNA an und die Erststrang-cDNA-Synthese erfolgt vom 5' zum 3' Ende.

Der Reaktionsmix für die cDNA-Synthese-Reaktion ist in Tabelle 8 beschrieben.

Tabelle 8: Reaktionsmix für cDNA-Synthese einer spezifischen miRNA mit dem TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems-System)

| | |
|-----------------------------------------------|---------|
| 100 mM dNTPs | 0,15 µl |
| MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U / µl | 1,0 µl |
| 10x Reverse Transkriptionspuffer | 1,5 µl |
| RNase Inhibitor, 20 U / µl | 0,19 µl |
| 5x Primer RT Zielgen | 3,0 µl |
| 5x Primer RT Referenzgen (U6 snRNA) | 3,0 µl |
| RNase-freies H ₂ O | 1,16 µl |
| gesamt | 10,0 µl |

Die 10 µl wurden in die Probestaschen einer zugeschnittenen 96-Well Platte pipettiert. Anschließend wurden 5 µl einer auf 50 ng/µl verdünnten RNA zu jeder Reaktion dazugegeben. Der Reaktionsansatz wurde verschlossen, herunterzentrifugiert und 5 min auf Eis gelagert. Danach wurde das Gemisch im T3000 Thermocycler (Biometra) für 30 min bei 16°C und für weitere 30 min bei 42° C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym Reverse Transkriptase durch fünfminütiges Erhitzen auf 85°C inaktiviert. Zum Schluß wurde das fertige cDNA-Produkt sofort auf 4° C heruntergekühlt und im Gefrierschrank bei -20°C gelagert. Da die Stem-

Loop Primer für jedes Zielgen spezifisch sind, muss für jedes Zielgen eine neue cDNA hergestellt werden. Nach der cDNA-Synthese erfolgte die qPCR. Hier wurde mittels der Vorwärts- und Rückwärtsprimer die cDNA vervielfältigt. Der Reaktionsmix ist in Tabelle 9 beschrieben.

Tabelle 9: Reaktionsmix pro RT-qPCR Reaktion

| | |
|------------------------------------------------|---------|
| 20x TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit | 1,0 µl |
| 2x TaqMan® Universal PCR Master Mix | 10,0 µl |
| RNase-freies H ₂ O | 8,0 µl |
| cDNA Produkt | 1,0 µl |
| gesamt | 20,0 µl |

3.3.6 Auswertung der qPCR-Läufe

Zur Bestimmung der Genexpression wurde eine semiquantitative fluoreszenzbasierte qPCR durchgeführt. Durch die Einlagerung des fluoreszierenden Farbstoffs SYBR®Green, der sich während der Doppelstrang-Synthese einlagert, bzw. durch die Verwendung von sequenzspezifischen TaqMan®-Sonden kann die Quantifizierung der DNA in Echtzeit erfolgen. Die Fluoreszenz nimmt proportional zur synthetisierten Menge der PCR-Produkte zu. Nach Ablauf von in der Regel 40 Zyklen erfolgt die Quantifizierung in der exponentiellen Phase, da hier alle für die PCR-Reaktion notwendigen Reagenzien in ausreichender Menge vorliegen. Die Berechnung des *fold change* (Fc) erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Livak *et al.*, 2001). C_T -Werte („*cycle of threshold*“) und Schwellenwert-Bestimmung erfolgte durch die StepOne™ Software v2.0. Der C_T -Wert ist der Wert, an dem die Fluoreszenzintensität die Basisfluoreszenzintensität signifikant übersteigt. Je niedriger der C_T -Wert, umso mehr Kopien des Zielgens sind zu Beginn der Reaktion vorhanden. Als erstes wurde der Mittelwert der Replikate der Ziel- und Referenzgene gebildet. Anschließend wird der ΔC_T -Wert errechnet, in dem für jede Probe der Mittelwert des Referenzgens (U6 snRNA) vom Mittelwert des jeweiligen Zielgens (miRNA) subtrahiert wurde. Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert wurde anschließend errechnet, in dem man vom ΔC_T -Wert einer Probe den ΔC_T -Wert des Kalibrators abzieht. Durch Entlogarithmierung der $\Delta\Delta C_T$ -Werte ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) erhält man die relative miRNA-Expression in der Gewebeprobe. Dabei wird die miRNA-Expression im Kalibrator (*Universal human reference RNA*-Probe) gleich 1 gesetzt. Eine Expression der miRNA in einer Tumorprobe von >1 bedeutet

eine Überexpression der miRNA, ein Expressionsniveau von <1 bedeutet eine geringere Expression der miRNA im Vergleich zur Kalibratorprobe.

3.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Bestimmung der Größe und Integrität von aus Zellen oder Geweben extrahierter RNA und DNA bzw. daraus generierten PCR-Produkten. Die RNA- bzw. DNA-Moleküle werden durch die Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und können mit Markern bekannter Größe verglichen werden. Das Gel wird aus Agarose und TRIS-Acetat EDTA-Puffer hergestellt und enthält den DNA-bindenden Farbstoff *Midori Green*. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes ziehen negativ geladene Nukleinsäure-Moleküle durch die Gelporen in Richtung des Pluspols. Je größer die Nukleinsäurestränge sind, umso langsamer wandern diese, sodass eine Auftrennung nach der Größe erfolgt. Nach Ablauf der Gelelektrophorese, die ca. 20-30 min dauert, wird das Gel mit UV-Licht beleuchtet und fotografiert. Durch den Vergleich mit einer DNA-Leiter kann die Länge der aufgetrennten Nukleinsäuren bestimmt werden. Die Agarosegelelektrophorese wurde nach der RNA-Isolierung durchgeführt, um sicherzustellen, dass die extrahierte RNA nicht degradiert ist.

3.5 Transiente Transfektion der Glioblastomzelllinien (Überexpression / Inhibierung der microRNA)

Die Zelllinien wurden, abhängig von der jeweiligen Verdopplungszeit, mit einer Dichte wie in Tabelle 10 ausgewiesen, in eine 6-Well Platte in 2 ml DMEM mit FCS pro Well ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit miRIDIAN™ microRNA Mimics (im Folgenden als Mimic bezeichnet) oder miRIDIAN™ microRNA Hairpin Inhibitors (im Folgenden als Inhibitor bezeichnet) und Kontrollmolekülen miRIDIAN microRNA Mimics Negative Control #1 (im Folgenden als Mimic-NC) oder miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor Negative Control #1 verwendet (im Folgenden als Inhibitor-NC bezeichnet) in einer Konzentration von 80 nM transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent und Opti-MEM™ nach Herstellerangaben (Life Technologies). Für den Zellüberlebenstest wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion geerntet und in 96 Well-Platten, mit einer Zellzahl wie in Tabelle 11 ausgewiesen, überführt.

Tabelle 10: Zellzahl pro 6-Well Platte

| Zelllinie | Zellzahl / Well |
|------------------------|-----------------|
| LN-18_P LN-18_R | 400.000 Zellen |
| LNT-229_P LNT-229_R | 400.000 Zellen |
| LN-308_P LN-308_R | 500.000 Zellen |

Tabelle 11: Zellzahl pro 96-Well Platte

| Zelllinie | Zellzahl / Well |
|------------------------|-----------------|
| LN-18_P LN-18_R | 300 Zellen |
| LNT-229_P LNT-229_R | 200 Zellen |
| LN-308_P LN-308_R | 300 Zellen |

3.6 Zellzahlbestimmung mit Trypanblau

Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion in der 6-Well Platte wurden die Zellen geerntet und in einer Konzentration von 5000 Zellen pro Well in eine 12-Well Platte transferiert. Die Zählung der Zellen sowie die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte in der Neubauer Zählkammer mittels Zugabe von 0,4% (w/v) Trypanblau, mit einer Verdünnung von 1:2. Die ermittelte Zellzahl wurde mal 2 genommen, da diese vorher durch die Verdünnung halbiert wurde. Tote Zellen werden durch Trypanblau komplett blau angefärbt, da die Farbe durch die beschädigte Membran hindurchgeht, während vitale Zellen ungefärbt bleiben. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden unter dem Mikroskop die vitalen Zellen in den vier großen Eckfeldern, jedes aus 16 Kleinquadraten bestehend, ausgezählt. Der Mittelwert wurde errechnet, indem die Summe aller vitalen Zellen durch die Anzahl der Eckfelder geteilt wurde und anschließend mal 2 genommen wurde, um den Verdünnungsfaktor zu berücksichtigen. Die Zellzahl/ml wurde

nach der folgenden Formel ermittelt: Mittelwert vitaler Zellen x 2 x Verdünnungsfaktor x 10^4 Zellen/ml.

3.7 Zellüberlebenstest („cell survival assay“)

Mit dem Zellüberlebenstest kann überprüft werden, ob Zellen nach einer Behandlung, z.B. mit einem Chemotherapeutikum, im Vergleich zur Kontrollgruppe Kolonien bilden und sich teilen können. Eine Kolonie besteht aus ca. 50 Zellen und kann mikroskopisch untersucht werden (Franken *et al.*, 2006). In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde jedoch nicht die Anzahl an Kolonien mikroskopisch untersucht, sondern die finale Zelldichte durch Anfärben der Zellen mit Kristallviolett und anschließender Absorptionsmessung bestimmt (Happold *et al.*, 2012) Im Folgenden werden die einzelnen Schritte des Assays beschrieben: Am ersten Tag wurden die Zellen in eine 6-Well Platte abhängig von der Zelllinie mit einer Dichte zwischen 400.000 und 500.000 Zellen (siehe Tabelle 10) in 2 ml DMEM mit FCS ausgesät. Am 2. Tag erfolgte die Transfektion der Zellen wie im Kapitel 3.5 beschrieben. Am 3. Tag wurden die Zellen in der Neubauer Zellkammer gezählt wie unter 3.6 aufgeführt. Noch am selben Tag wurden abhängig von der Verdopplungszeit der Zelllinie die Zellen in unterschiedlicher Dichte in einer 96-Well Platte ausgesät (Tabelle 11). Am 4. Tag wurde das Zellmedium DMEM durch serumfreies Medium ersetzt und die Zellen ansteigenden Konzentrationen von TMZ, wie in Tabelle 12 aufgeführt, ausgesetzt. Am 5. Tag wurde das fetale Kälberserum (FCS) zugesetzt, sodass es in einer 10% (v/v) FCS Konzentration im Medium vorlag. Über Nacht und in den folgenden 8-19 Tagen inkubierten die Zellen bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5% CO₂, wobei das Zellwachstum täglich unter dem Mikroskop kontrolliert wurde. In dieser Zeit wurde das Medium nicht gewechselt. Sobald das Well zu 90% von Zellen ausgefüllt war, wurde das Zellwachstum angehalten, in dem das Medium entfernt und Zellen mit 0,5% (w/v) Kristallviolett (50 µl/Well) angefärbt wurden. Für 15 Minuten wurden die angefärbten Zellen bei Raumtemperatur ruhen gelassen, bevor die Platten anschließend mit Wasser ausgewaschen und der Überstand an Kristallviolett entfernt wurde. Danach wurden die Platten für 24 Stunden an der Luft getrocknet und mit einer 0.1 M Natriumcitrat-Lösung (verdünnt in 50% (v/v) Ethanol) versetzt, um das verbleibende Kristallviolett zu verdünnen. Zum Schluß wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 560 nm mittels des Infinite® 200 PRO Multimode Mikroplatten-Lesegeräts (Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland) gemessen.

Tabelle 12: TMZ-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Zelllinie

| Zelllinie | TMZ-Konzentration in μM |
|-------------------------|------------------------------------------------------|
| LNT-229_P und LNT_229_R | 0; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 |
| LN-308_P und LN-308_R | 0; 12,5; 25; 50; 100; 200 |
| LN-18_P und LN-18_R | 0; 62,5; 125; 250; 500; 1000 |

3.8 Statistische Analysen

Die gezeigten Experimente sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt und mindestens drei Mal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt worden. Alle Zellüberlebensassays wurden gegen Kontrollexperimente, in denen nur das verdünnte Solvenz DMSO verwendet wurde, normalisiert. Eine Signifikanz wurde mittels des doppelseitigen ungepaarten und gepaarten T-test ermittelt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Der ungepaarte T-Test wurde verwendet, um die Expression einer miRNA in verschiedenen Gruppen (z.B. bei unterschiedlichen Glioblastomtumorpaaen) miteinander zu vergleichen. Der gepaarte T-test wurde bei Messwiederholungen verwendet (z.B. Abb. 12).

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung von TMZ-Resistenz-assoziierten miRNAs in Glioblastomzelllinien

Mittels microRNA-Microarrays (GeneChip® miRNA 2.0 Arrays von Affymetrix) wurde das Expressionsprofil von miRNAs in den drei parentalen (P) Glioblastomzelllinien LNT-229_P, LN-308_P und LN-18_P und ihren TMZ-resistenten (R) Zellklonen LNT-229_R, LN-308_R und LN-18_R untersucht. Das Expressionsprofil von miRNAs wurde paarweise analysiert, d.h. miRNA-Expressionsprofile der parentalen Zellen wurden mit Expressionsprofilen dazugehöriger resistenter Klone verglichen (Tabelle 6A). Des Weiteren wurde das Expressionsprofil gruppenweise analysiert: Die erste Gruppe, bestehend aus den drei parentalen Zelllinienpaaren, wurde mit der zweiten Gruppe bestehend aus drei resistenten Zelllinienpaaren verglichen (Tabelle 7A). Zusätzlich wurden in Kooperation mit Herrn Dr. Steffen Sass bioinformatische Analysen der Microarray-Daten durchgeführt (vgl. Stojcheva *et al.*, 2016).

4.2 Identifizierung differenziell exprimierter miRNAs durch paarweisen Vergleich der parentalen versus TMZ-resistenten LNT-229, LN-308 und LN-18 Gliomzelllinien

Im Paarvergleich konnten in der TMZ-resistenten LNT-229_R Zelllinie 54 hochregulierte und 43 runterregulierte miRNAs im Vergleich zu LNT-229_P ($F_c > 1,5$) nachgewiesen werden. In LN-308_R waren im Vergleich zu LN-308_P 36 miRNAs hochreguliert und 23 miRNAs herunterreguliert ($F_c > 1,5$). In LN-18_R waren im Vergleich zu LN-18_P ($F_c > 1,5$) 22 miRNAs hochreguliert und 32 miRNAs herunterreguliert (Tabelle 13).

Tabelle 13: Bioinformatische Auswertung der miRNA-Expressionsprofile im Paarvergleich der Gliomzelllinien LNT-229, LN-308 und LN-18. A. Das Expressionsniveau der miRNAs wurde paarweise zwischen parentalen und TMZ-resistenten Zellen einer Zelllinie verglichen. B. In LNT-229 resistenten Zellen konnten 54 überexprimierte und 43 runterregulierte miRNAs identifiziert werden. C. In LN-308 resistenten Zellen konnten 36 überexprimierte und 23 runterregulierte miRNAs identifiziert werden. D. In LN-18 resistenten Zellen konnten 22 überexprimierte und 32 runterregulierte miRNAs identifiziert werden.

A

| | |
|--------|-------------------------|
| Paar 1 | LNT-229_P vs. LNT_229_R |
| Paar 2 | LN-308_P vs. LN-308_R |
| Paar 3 | LN-18_P vs. LN-18_R |

B

| Paarvergleich: LNT-229 parental vs. resistent | |
|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| hochreguliert in resistenten Zellklonen (Fc>1,5) | herunterreguliert in resistenten Zellklonen (Fc>1,5) |
| 54 miRNAs, darunter <i>miR-195-5p, miR-181d-5p, miR-192-5p</i> | 43 miRNAs, darunter <i>miR-9-5p, miR-210-5p, miR-3172, miR-3131</i> |

C

| Paarvergleich: LN-308 parental vs. resistent | |
|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| hochreguliert in resistenten Zellklonen (Fc>1,5) | herunterreguliert in resistenten Zellklonen (Fc>1,5) |
| 36 miRNAs, darunter <i>miR-192-5p, miR-195-5p, miR-194-5p, miR-210-5p, miR-497-5p</i> | 23 miRNAs, darunter <i>miR-9-5p, miR-3172, miR-3131</i> |

D

| Paarvergleich: LN-18 parental vs. resistent | |
|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| hochreguliert in resistenten Zellklonen (Fc>1,5) | herunterreguliert in resistenten Zellklonen (Fc>1,5) |
| 22 miRNAs, darunter <i>miR-181d-5p</i> | 32 miRNAs, darunter <i>miR-210-5p</i> |

MiR-210-5p war als einzige miRNA in allen drei Paaren dereguliert: in LN-18 und LNT-229 war sie in resistenten Zellen herunterreguliert, während sie in resistenten LN-308-Zellen hochreguliert war. Weiterhin waren mehrere miRNAs (*miR-9-5p, miR-192-5p, miR-195-5p, miR-181d-5p*) in zwei von drei Paaren dereguliert. Im nächsten Schritt wurde untersucht, welche miRNAs im Gruppenvergleich dereguliert sind.

4.3 Identifizierung differenziell exprimierter miRNAs durch gruppenweisen Vergleich der parentalen *versus* TMZ-resistenten LNT-229, LN-308 und LN-18 Gliomzelllinien

Im Gruppenvergleich (Tabelle 14) wurden die drei parentalen Zelllinien (LNT-229_P, LN-308_P, LN-18_P) gegen die drei TMZ-resistenten Zelllinien (LNT-229_R, LN-308_R, LN-18_R) verglichen. Im Vergleich zu der Gruppe mit den parentalen Zelllinien, waren acht miRNAs in resistenten Zelllinien mit einem Fc >1,5 hoch- (*miR-181d-5p*, *miR-185-5p*, *miR-138-5p*, *miR-192-5p*, *miR-195-5p*, *miR-194-5p*, *miR-497-5p*) und fünf miRNAs (*miR-9-5p*, *miR-29a-5p*, *miR-939-5p*, *miR-3131*, *miR-3172*) herunterreguliert.

Tabelle 14: Bioinformatische Auswertung der miRNA-Expressionsprofile im Gruppenvergleich der Gliomzelllinien LNT-229, LN-308 und LN-18. A. Die Expressionsprofile der miRNAs wurde gruppenweise zwischen den drei parentalen und den drei TMZ-resistenten Zelllinien verglichen. B. Im Gruppenvergleich konnten sieben hoch- und fünf runterregulierte miRNAs in resistenten Zellen identifiziert werden.

A

| Gruppe 1 – alle parentalen Zelllinien | Gruppe 2 – alle resistenten Zelllinien |
|---------------------------------------|----------------------------------------|
| LNT-229_P | LNT_229_R |
| LN-308_P | LN-308_R |
| LN-18_P | LN_18_R |

B

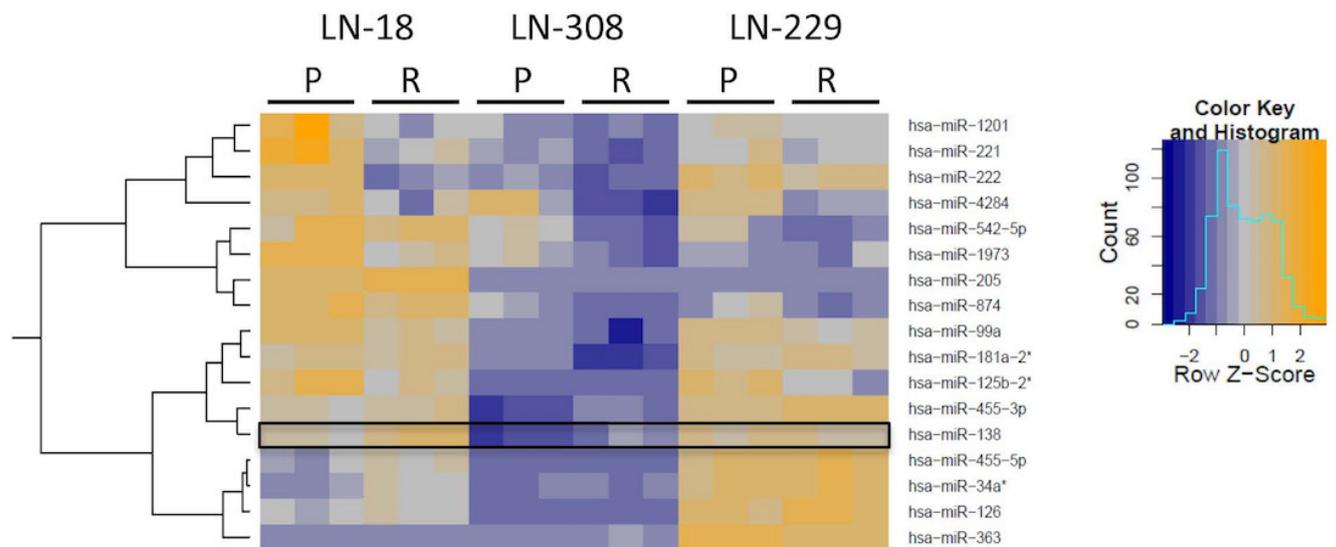
| Gruppenvergleich: der drei parentalen vs. drei resistenten Zellklone LNT-229, LN-308, LN-18 | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| hochreguliert in resistenten Zellklonen (Fc>1,5) | herunterreguliert in resistenten Zellklonen (Fc>1,5) |
| <i>miR-181d-5p</i> , <i>miR-185-5p</i> , <i>miR-138-5p</i> , <i>miR-192-5p</i> , <i>miR-195-5p</i> , <i>miR-194-5p</i> , <i>miR-497-5p</i> | <i>miR-9-5p</i> , <i>miR-29a-5p</i> , <i>miR-939-5p</i> , <i>miR-3131</i> , <i>miR-3172</i> |

MiR-181d-5p, *miR-192-5p*, *miR-195-5p* und *miR-3131*, die bereits schon im Paarvergleich (Tabelle 13) eine differenzielle Expression zeigten, konnten ebenfalls im Gruppenvergleich (Tabelle 14) als Chemotherapieresistenz-assoziierte miRNAs identifiziert werden. Anschließend wurde die differenzielle Expression ausgewählter Chemotherapieresistenz-assoziiierter miRNAs mittels qPCR validiert.

4.4 Identifizierung differenziell exprimierter miRNAs durch bioinformatische Auswertung der parentalen *versus* TMZ-resistenten LNT-229, LN-308 und LN-18 Gliomzelllinien

Zusätzlich zu den o.g. Gruppenvergleichen erfolgte eine bioinformatische Auswertung der Mikroarray-basierten miRNA-Expressionsanalyse in den parentalen und TMZ-resistenten Glioblastomzelllinien LNT-229, LN-308 und LN-18 durch Herrn Dr. Steffen Sass aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Fabian Theis, Helmholtz-Zentrum München, welche verschiedene weitere, differenziell exprimierte miRNAs offenlegte, die in der *Heat-Map* (Abb. 7 A, entnommen aus Stojcheva *et al.*, 2016) zusammengefasst dargestellt werden. Für *miR-138-5p* ist zusätzlich ein Box-Plot Diagramm (Abb. 7 B, entnommen aus Stojcheva *et al.*, 2016) erstellt worden, das die Expressionsunterschiede der miRNA in den parentalen und TMZ-resistenten Zellen verdeutlicht.

A



B

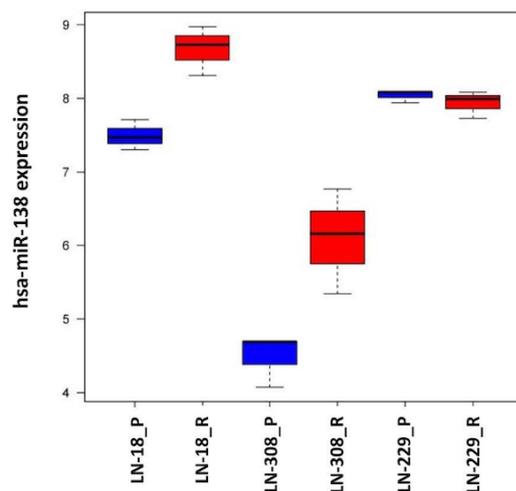


Abb. 7: Differenziell exprimierte miRNAs nach Mikroarray-basierter Expressionsanalyse in parentalen und TMZ-resistenten Gliomzelllinien LNT-229, LN-18 und LN-308 (Abbildung entnommen aus Stojcheva *et al.*, 2016). A. *Heatmap* differenziell exprimierter miRNAs. Nach Hybridisierung auf GeneChip® miRNA 2.0 Arrays wurde das Expressionsprofil von miRNAs in den drei parentalen (P) Glioblastomzelllinien LNT-229_P, LN-308_P und LN-18_P und ihren TMZ-resistenten (R) Zellklonen LNT-229_R, LN-308_R und LN-18_R bioinformatisch ausgewertet und als *Heatmap* dargestellt. Die Ergebnisse wurden durch Hybridisierung von jeweils drei Chargen von jeder P und R Zelllinie erzielt. Reihen und Spalten wurden mittels der R-basierten *hclust* Methode hierarchisch geclustert. Die Abstände der Expressionsprofile wurden basierend auf den Pearson Korrelationskoeffizienten zwischen miRNAs und Proben berechnet (Stojcheva *et al.*, 2016). B. Box-Plot Darstellung der *miR-138* Expression in LNT-229_P, LN-308_P und LN-18_P sowie LNT-229_R, LN-308_R und LN-18_R basierend auf den Mikroarray-Daten (Stojcheva *et al.*, 2016).

Die *Heat-map* zeigt differenziell exprimierte miRNAs in den drei parentalen (P) Glioblastomzelllinien LNT-229_P, LN-308_P und LN-18_P und ihren TMZ-resistenten (R) Zellklonen LNT-229_R, LN-308_R und LN-18_R auf. Unter anderem wurden *miR-221*, *miR-181a* und *miR-125b* als differenziell exprimierte miRNAs identifiziert, zu denen bereits Studien im Zusammenhang mit TMZ-Resistenz im Glioblastom vorlagen (siehe Kapitel 1.3.3). Das Box-Plot Diagramm zeigt, dass *miR-138-5p* in TMZ-resistenten Zellklonen der Glioblastomzelllinien LN-18 und LN-308 überexprimiert ist, nicht jedoch in LNT-229_R.

4.5 Validierung der differentiellen Expression ausgewählter miRNAs in Glioblastomzellen mittels quantitativer RT-PCR

Die differentielle Expression der in den Microarray-Analysen identifizierten miRNA-Kandidaten wurde anschließend mittels qPCR in den parentalen und TMZ-resistenten Zelllinien validiert. Für die qPCR wurden die miRNAs ausgewählt, die im Gruppenvergleich einen *Fold Change* (Fc) $>1,5$ und einen p-Wert von $<0,05$ (*miR-3131*, *miR-185-5p*, *miR-192-5p*, *miR-939-5p*, *miR-29a-5p*) sowie im Paarvergleich mindestens einen Fc $>1,5$ hatten (wie z.B. *miR-181d-5p*, *miR-195-5p*, *miR-497-5p*, *miR-9-5p*). Dabei wurde die Expression der ausgewählten miRNAs sowohl in den zur Microarray-Analyse verwendeten Zelllinien-Proben (Screening-Probe; 1. Charge) als auch in RNA-Proben aus einer späteren Passage der drei Gliomzelllinien (spätere Passage; 2. Charge) bestimmt. Da für die Zelllinie LN-308 der Resistenzmechanismus bislang unbekannt ist, wurde die Expression der ausgewählten, differenziell exprimierten miRNAs in drei technischen Replikaten einer Passage dieser Zelllinie bestimmt. Der Mittelwert (MW) vom Fold change (Fc) ergibt sich aus den technischen Replikaten einer Probe. Der Fc der parentalen Zellen ist gleich 1 gesetzt. MW Fc >1 zeigt eine erhöhte Expression der jeweiligen miRNA, bzw. <1 eine verminderte Expression in den resistenten Zellen. Ist der Wert gleich 1, so liegt kein Expressionsunterschied vor (Tabelle 15).

Von den insgesamt 12 untersuchten miRNAs konnte eine differenzielle Expression nur für fünf miRNAs mittels qPCR validiert werden: *miR-181d-5p*, *miR-192-5p*, *miR-9-5p*, *miR-210-5p* und *miR-138-5p*. *MiR-210-5p* war dabei als einzige miRNA in allen drei Zelllinien dereguliert: signifikant herunterreguliert in jeweils einer Zellcharge der resistenten Zellen von LNT-229 und LN-18, hochreguliert in den resistenten Zellen von LN-308 sowie in drei technischen Replikaten von LN-308. Dies entspricht dem Ergebnis aus der Microarray-Analyse. *MiR-192-5p* war in beiden Zellchargen der resistenten Zellen von LNT-229 und LN-18 hochreguliert, jedoch ohne signifikante Expressionsunterschiede in LN-308. *MiR-9-5p* war als einzige miRNA in einer Zellcharge von LN-308 sowie den drei technischen Replikaten herunterreguliert. Außerdem war sie in einer Zellcharge von LN-18 hochreguliert. *MiR-138-5p* war als einzige miRNA sowohl in einer Zellcharge von LN-18, als auch in einer Zellcharge von LN-308 sowie den drei technischen Replikaten von LN-308 hochreguliert. *MiR-1909* ist als differenziell exprimierte miRNA in Microarray-Analysen der drei technischen Replikate von LN-308 identifiziert worden und wurde deswegen auch nur in diesen mittels qPCR validiert. Da die differenzielle Expression dieser miRNA nicht validiert werden konnte, wurde auch keine Expressionsbestimmung in den anderen Zelllinien durchgeführt. Für *miR-3131* gab es zum Zeitpunkt der qPCR-Validierung kein passendes Primerset, sodass diese miRNA in den Gliomzellen nicht validiert werden konnte.

4.6 Expressionsanalyse ausgewählter miRNA-Kandidaten in Rezidivgliompaaren mittels quantitativer RT-PCR

Die Expression von acht ausgewählten, gemäß der Microarray-Untersuchungen zwischen parentalen und TMZ-resistenten Zelllinien differenziell exprimierten miRNAs wurde zunächst in sechs Tumorpaaren bestehend aus dem Primärtumor vor und dem zugehörigen Rezidivtumor nach Radiotherapie und TMZ-Behandlung mittels qPCR validiert (Tabelle 16).

Tabelle 16: Übersicht der qPCR basierten Validierung der Expression von miRNAs in sechs Tumorkörpern (Tumorkörper 1. bis 6.) bestehend aus Primärtumoren und Rezidiven nach TMZ-Behandlung. Jede Tumorkörperprobe wurde als Duplikat untersucht und jeder qPCR-Lauf wurde zwei mal wiederholt. U6 snRNA diente als Referenz zur Normalisierung der Expression der miRNAs und als Kalibrator wurde Universal human Reference RNA verwendet.

Für die statistische Auswertung wurde der ungepaarte Student's t-Test verwendet. Signifikante Expressionsunterschiede: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$. Verstärkte Expression: grau schattiert; verminderte Expression: netzartig schattiert. Weiße Felder: keine signifikanten Expressionsunterschiede.

| Tumorkörper | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| miRNA | MW FC | MW FC | MW FC | MW FC | MW FC | MW FC |
| <i>miR-181d-5p</i> | 3,6 | 0,6 | 6,8 | 0,9 | 2,8* | 2,6 |
| <i>miR-192-5p</i> | 6,6** | 2,5** | 2,4* | 1,9* | 1,9* | 2,6* |
| <i>miR-194-5p</i> | 8,0 | 2,8 | 3,5 | 2,2 | 2,9 | 2,0 |
| <i>miR-497-5p</i> | 1,8 | 1,8 | 1,4 | 1,0 | 2,6 | 1,2 |
| <i>miR-9-5p</i> | 4,4 | 0,4* | 1,2 | 1,0 | 2,3 | 3,5 |
| <i>miR-210-5p</i> | 7,3 | 2,6 | 1,5 | 1,6 | 1,0 | 3,7 |
| <i>miR-185-5p</i> | 4,0 | 2,4 | 1,7 | 1,6 | 3,4* | 2,5 |
| <i>miR-138-5p</i> | 1,9* | 7,7* | 1,6* | 1,3* | 2,0* | 2,8* |

Die miRNAs *miR-192-5p* und *miR-138-5p* sind in allen sechs untersuchten Tumorkörperrezidiven im Vergleich zum Primärtumor verstärkt exprimiert. *miR-181d-5p*, *miR-185-5p* und *miR-9-5p* waren in jeweils einem Tumorkörperpaar differenziell exprimiert. Nach der ersten Überprüfung der differenziellen Expression der acht ausgewählten miRNAs in sechs Tumorkörperpaaren wurde die Tumorkörperanzahl auf insgesamt zehn Tumorkörperpaare erhöht. Die *miR-210-5p* war, obwohl sie in den drei Glioblastomzelllinien dereguliert war, hier in keinem der Tumorkörperpaare differenziell exprimiert. Aufgrund geringer Tumorkörpergewebemengen wurde nur für die relevanten miRNAs *miR-192-5p* und *miR-138-5p* in allen zehn Tumorkörperpaaren das Expressionsniveau bestimmt (Abb. 7 und 8). Da *miR-29-5p* und *miR-195-5p* in den Gliomzelllinien nicht differenziell exprimiert waren (Tabelle 15), wurde die Expression in den Tumorkörperpaaren nicht weiter untersucht.

4.7 Expressionsanalyse von *miR-192-5p* in gepaarten Primär- und Rezidivgliomen

Die Expressionsanalyse von *miR-192-5p* erfolgte in insgesamt zehn Tumorkörpern bestehend aus Primärtumor und Rezidivtumor nach der Chemotherapiebehandlung mit TMZ (Abb. 8).

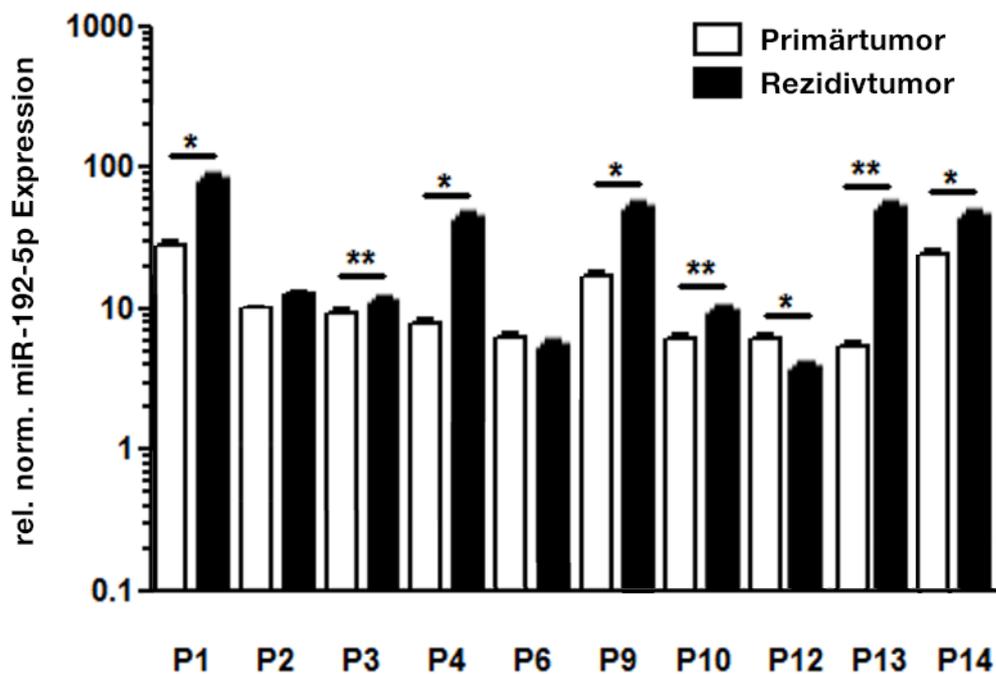


Abb. 8: Relative Expressionslevel der *miR-192-5p* in 10 Tumorkörpern bestehend aus Primärtumor vor und Rezidivtumor nach Radiotherapie und TMZ-Behandlung. Jede Probe wurde als Duplikat untersucht und jeder qPCR-Lauf wurde zweimal wiederholt. U6 snRNA diente als Referenz zur Normalisierung der Expression der miRNAs und als Kalibrator wurde Universal human Reference RNA verwendet. Für die statistische Auswertung wurde der ungepaarte Student's t-Test verwendet. Signifikante Expressionsunterschiede: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Die relative Expression der *miR-192-5p* war in sieben von 10 Rezidivtumoren signifikant höher und in einem von 10 Rezidivtumoren signifikant niedriger als im jeweils zugehörigen Primärtumor.

4.8 Expressionsanalyse von *miR-138-5p* in gepaarten Primär- und Rezidivgliomen

Die Expressionsanalyse von *miR-138-5p* erfolgte in insgesamt zehn Tumorkopien bestehend aus Primärtumor vor und Rezidivtumor nach der Radiochemotherapiebehandlung mit TMZ.

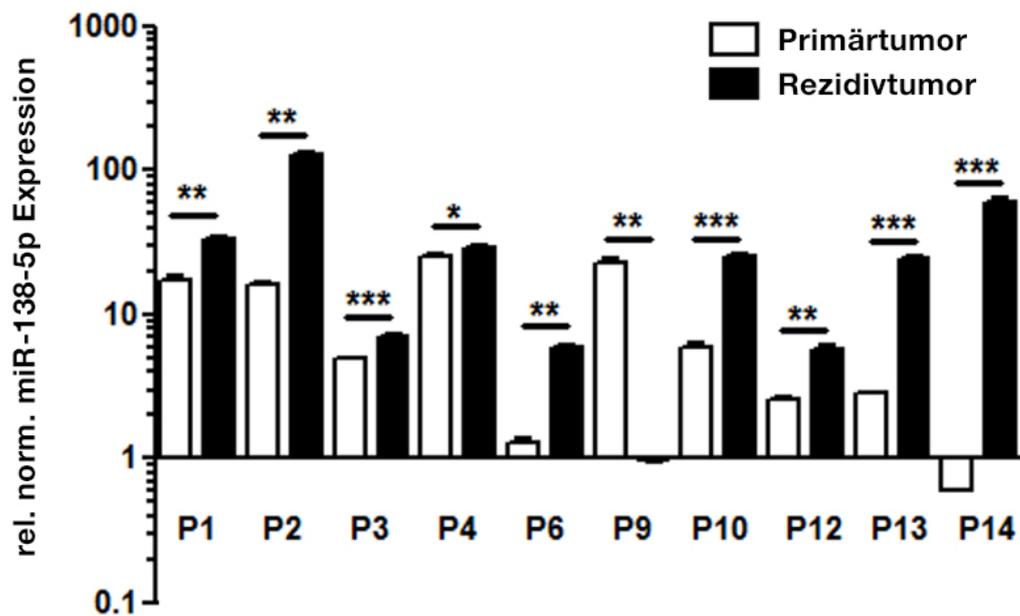


Abb. 9: Relative Expressionslevel der *miR-138-5p* in 10 Tumorkopien bestehend aus Primärtumor vor und Rezidivtumor nach Radiotherapie und TMZ-Behandlung. Jede Probe wurde als Duplikat untersucht und jeder qPCR-Lauf wurde zweimal wiederholt. U6 snRNA diente als Referenz zur Normalisierung der Expression der miRNAs und als Kalibratorprobe wurde Universal human Reference RNA verwendet. Für die statistische Auswertung wurde der ungepaarte Student's t-Test verwendet. Signifikante Expressionsunterschiede: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Die relative Expression der *miR-138-5p* war in neun von 10 Rezidivtumoren signifikant höher und in einem von 10 Rezidivtumoren signifikant niedriger als im jeweils zugehörigen Primärtumor. Anschließend erfolgte die funktionelle Analyse von *miR-138-5p* und *miR-9-5p*, um ihre mögliche Rolle in der TMZ-Resistenz von Gliomzellen näher zu untersuchen.

4.9 Funktionelle Analysen zur Rolle ausgewählter miRNAs für das Ansprechen von Gliomzellen auf TMZ

Die validierte differenzielle Expression der microRNAs *miR-138-5p*, *miR-9-5p* und *miR-192-5p* in parentalen und TMZ-resistenten Gliomzelllinien sowie in Tumorpaaren bestehend aus unbehandeltem Primärtumor und Rezidivtumor nach Radiotherapie und TMZ-Behandlung deuteten daraufhin, dass diese miRNAs eine Rolle in der Chemotherapieresistenz gegen TMZ spielen könnten. Diese miRNAs wurden daher als Kandidaten für weiterführende funktionelle Analysen ausgewählt. Da der Resistenzmechanismus in LN-308 bisher unbekannt und daher auch von besonderem Interesse war, wurde zusätzlich *miR-9-5p* ausgewählt, da diese miRNA als einzige miRNA in einer Zellpassage von LN-308 sowie in drei technischen Replikaten einer Passage von LN-308 im Vergleich zu parentalen LN-308 Zellen vermindert exprimiert war. Die Ausgangsfrage dieser Arbeit war, ob differenziell exprimierte miRNAs die Resistenz gegenüber TMZ modulieren können. Mit dem Zellüberlebenstest sollte überprüft werden, welchen Effekt eine Deregulation dieser ausgewählten miRNAs auf die TMZ-Sensitivität von Gliomzellen hat. Zunächst wurde die Transfektionseffizienz nach Transfektion der Zellen mit dem jeweiligen miRNA-Mimic bzw. miRNA-Inhibitor von *miR-138-5p* bzw. *miR-9-5p* überprüft.

4.10 Modulation der Expression ausgewählter miRNAs durch Transfektion der Gliomzellen mit miRIDIAN™ microRNA Hairpin Inhibitors oder miRIDIAN™ microRNA Mimics

Basierend auf den vorgestellten qPCR-Ergebnissen wurde *miR-192-5p* als interessanter Kandidat ausgewählt und von Frau Dr. Stojcheva aus der Arbeitsgruppe von Herr Prof. Weller in Zürich weiter funktionell untersucht, während in dieser vorliegenden Studie die Rolle der miRNAs *miR-9-5p* und *miR-138-5p* in der Chemotherapieresistenz von Gliomzellen weiter untersucht wurde. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde die Expression der jeweiligen miRNA nach Transfektion der Zellen mit miRIDIAN™ microRNA Hairpin Inhibitors (im Folgenden als Inhibitor bezeichnet) bzw. mit miRIDIAN™ microRNA Mimics (im Folgenden als Mimic bezeichnet) bestimmt und in Relation zur Expression der miRNA in Kontroll-transfizierten Zellen gesetzt. Als Kontrolle der Transfektion mit Inhibitoren wurde

miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor Negative Control #1 verwendet (im Folgenden als Inhibitor-NC bezeichnet). Als Kontrolle für die Transfektion mit Mimics wurde die miRIDIAN microRNA Mimics Negative Control #1 (im Folgenden als Mimic-NC) eingesetzt. Dabei wurden Konzentrationen von 80 nM an Mimics bzw. Inhibitoren und den entsprechenden Kontrollen verwendet, um die parentalen und resistenten Gliomzelllinien zu transfizieren. Die Transfektionseffizienz wurde nach 24 h, 48 h und 72 h bestimmt.

In der qPCR-basierten Validierung der Expression von miRNAs (Tabelle 15) war die Expression von *miR-138-5p* in TMZ-resistenten LN-308 und LN-18 Gliomzellen erhöht und in LNT-229 Gliomzellen niedriger, als in den jeweiligen parentalen Zellen. Daher wurden die parentalen LN-308 und LN-18 Zellen sowie die TMZ-resistenten LNT-229 Zellen mit entsprechenden Mimics transfiziert. Weiterhin wurden die TMZ-resistenten LN-308, LN-18 und parentalen LNT-229 Zellen mit entsprechenden Inhibitoren transfiziert, um den Effekt auf die TMZ-Sensitivität zu überprüfen. In der qPCR-basierten Validierung war die Expression von *miR-9-5p* in den TMZ-resistenten Gliomzellen LN-308 niedriger und in LN-18 höher, als in den jeweiligen parentalen Zellen. Daher wurden die TMZ-resistenten Gliomzellen LN-308 und die parentalen LN-18 mit den jeweiligen Mimics und vice versa die parentalen LN-308 und die TMZ-resistenten LN-18 Zellen mit den jeweiligen Inhibitoren transfiziert. In den beiden Chargen von LNT-229 war *miR-9-5p* nicht differenziell exprimiert. Um zu überprüfen, ob mittels Mimics und Inhibitoren sich die Expression von *miR-9-5p* in den LNT-229 Zellen modulieren lässt, wurden die TMZ-resistenten LNT-229 Zellen mit Mimics und die parentalen Zellen mit Inhibitoren transfiziert (Abb. 10).

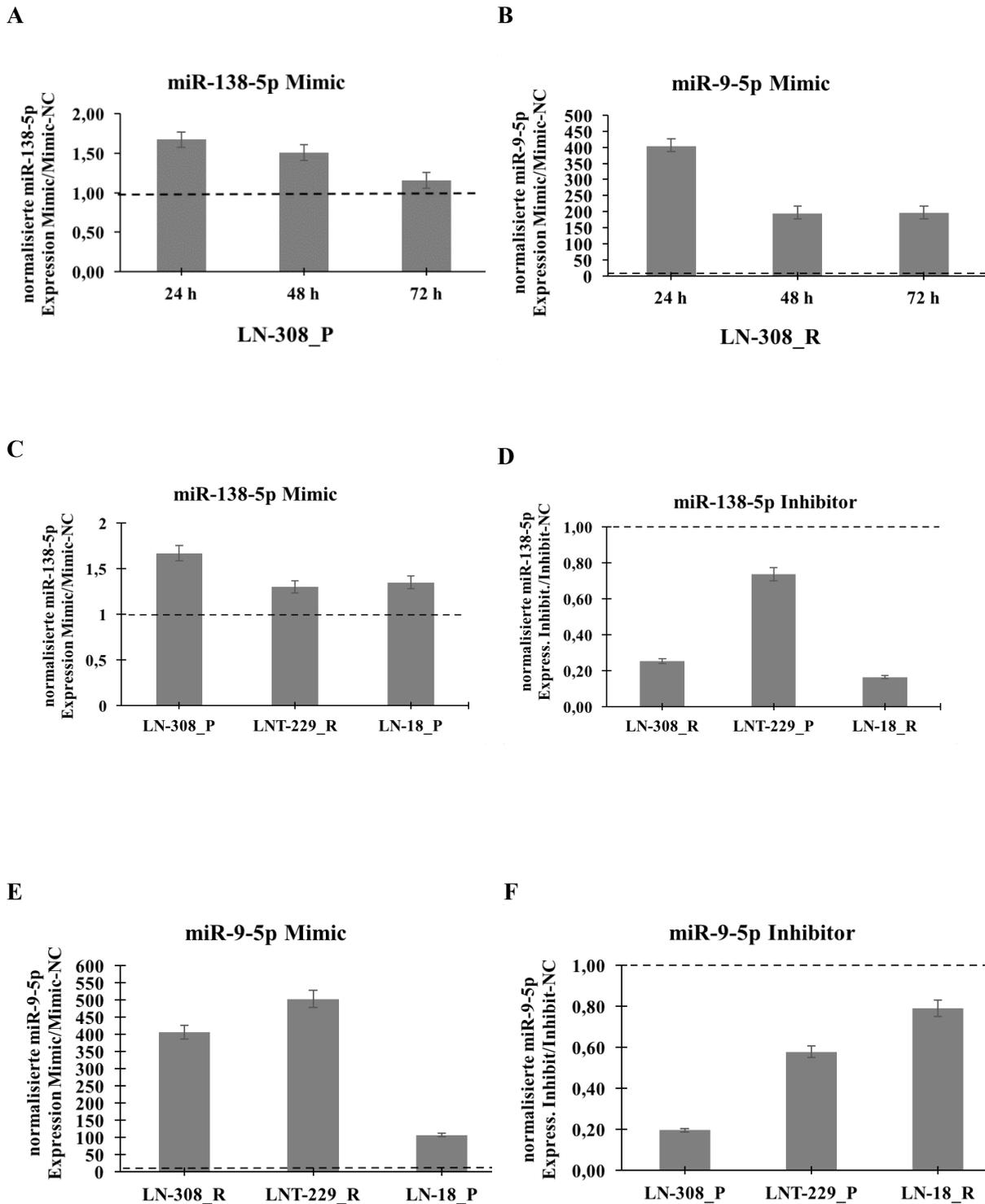


Abb. 10: Modulation der miRNA-Expression durch Transfektion von Gliomzellen mit miRNA Mimics bzw. Inhibitoren. Die drei Gliomzelllinien LN-308, LNT-229 und LN-18 wurden mit *miR-138-5p* (A, C) oder *miR-9-5p* (B, E) Mimics transfiziert, um die entsprechende miRNA zu überexprimieren. Durch Transfektion mit *miR-138-5p* (D) oder *miR-9-5p* (F) Inhibitoren sollte die Expression der entsprechenden miRNA herunterreguliert werden. A, B. Bestimmung der Expression der entsprechenden miRNAs 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion mit *miR-138-5p* (A) bzw. *miR-9-5p* (B)

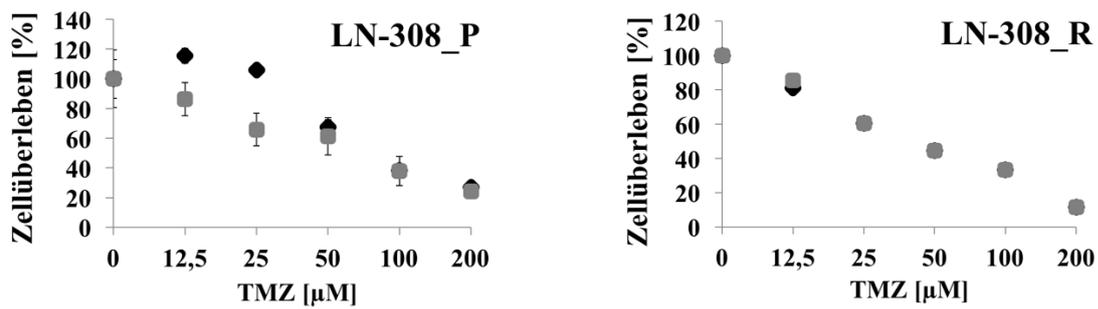
Mimics im Verhältnis zur Expression der miRNA in Mimic-NC transfizierten Zellen. C, D. Expression von *miR-138-5p* (C) in 80 nM Mimic- bzw. 80 nM Inhibitor-transfizierten (D) Zellen 24 h nach Transfektion. E, F. Expression von *miR-9-5p* (E) in 80 nM Mimic- bzw. 80 nM Inhibitor-transfizierten (F) Zellen 24 h nach Transfektion. Die Bestimmung der miRNA-Expression nach Transfektion mit Mimics oder Inhibitoren erfolgte mittels qPCR. Die Expression der miRNAs in den Zellen wurde zur Expression von U6 snRNA normalisiert. Die Expressionswerte der Mimic- bzw. Inhibitor-transfizierten Zellen wurden im Verhältnis zur miRNA-Expression in Mimic-NC- bzw. Inhibitor-NC-transfizierten Zellen berechnet, wobei die Expression der miRNA in den Kontroll-transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt wurde (gestrichelte Linie).

Unabhängig vom transfizierten Zelltyp führte eine Transfektion mit *miR-138-5p* Mimics kaum zu einer erhöhten Expression der miRNA. Die Transfektion mit *miR-9-5p* Inhibitoren führte zu einer Herunterregulation, die Transfektion mit *miR-9-5p* Mimics zu einer Hochregulation, zeigt aber für *miR-9-5p* ein heterogenes Ergebnis: die TMZ-resistenten Gliomzellen LN-308 und LNT-229 zeigten nach der Transfektion eine deutlich höhere *miR-9-5p* Expression, im Vergleich zu den parentalen Zellen LN-18. Im nächsten Schritt wurden die Gliomzellen trotz geringer Transfektionseffizienz mit Mimics bzw. Inhibitoren gegen *miR-138-5p* transfiziert, um zu untersuchen, ob bereits eine geringe Überexpression bzw. Herunterregulation dieser miRNA Auswirkungen auf die TMZ-Sensitivität hat.

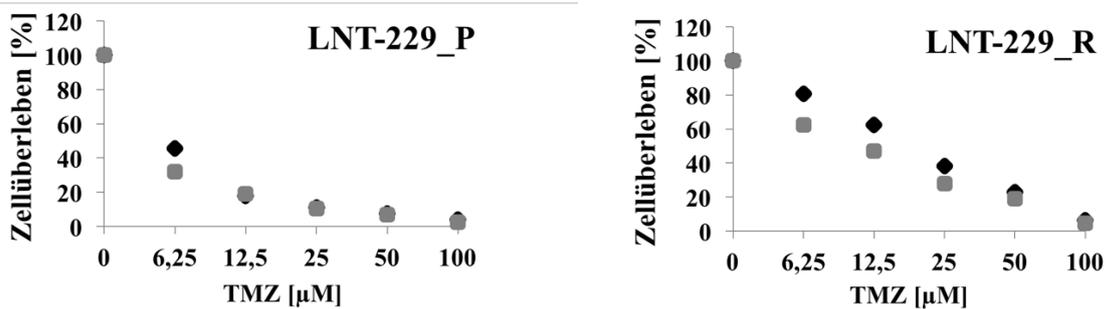
4.11 Auswirkung der Transfektion von Gliomzellen mit *miR-138-5p* Mimic-Molekülen auf die TMZ-Sensitivität

Die TMZ-Sensitivität von LN-308, LNT-229 und LN-18 Gliomzellen wurde mittels Zellüberlebenstest bestimmt. Dazu wurden parentale und TMZ-resistente Zellen der Zelllinie LN-308, LNT-229 und LN-18 mit 80 nM *miR-138-5p* Mimic bzw. Mimic-NC transfiziert und 24 h nach Transfektion mit verschiedenen TMZ-Konzentrationen abhängig von der jeweiligen Zelllinie (Tabelle 12) für 24 h behandelt. Die Bestimmung der Überlebensrate erfolgte abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen, 8-19 Tage nach Transfektion durch Trypanblau-Färbung der Zellen und Auslesen der optischen Dichte bei 560 nm (Abb. 11).

A



B



C

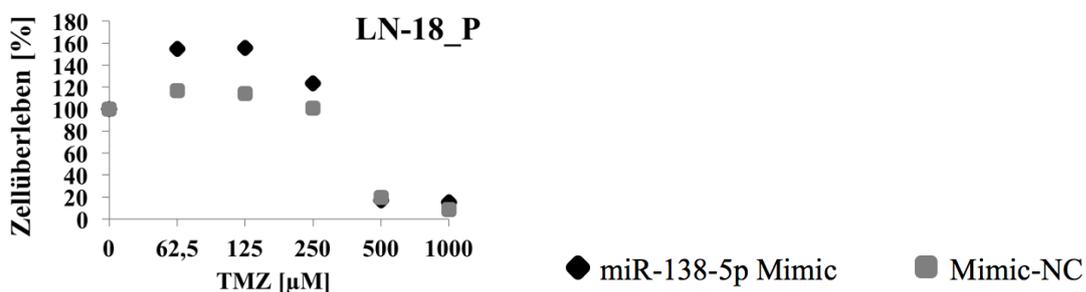


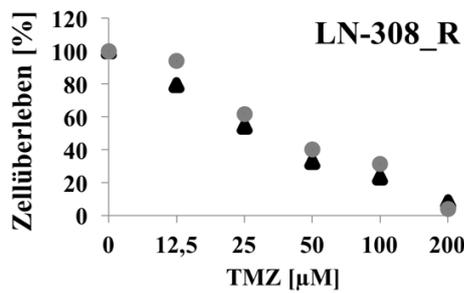
Abb. 11: TMZ-Sensitivität von LN-308, LNT-229 und LN-18 Gliomzellen nach Transfektion von *miR-138-5p* Mimic-Molekülen. A, B, C. Transfektion von LN-308_P und LN-308_R Zellen (A), LNT-229_P und LNT-229_R Zellen (B) sowie LN-18_P Zellen (C) mit 80 nM *miR-138-5p* Mimic bzw. Mimic-NC. Die TMZ-Sensitivität der *miR-138-5p* Mimic- oder Mimic-NC-transfizierten Zellen wurde mittels Zellüberlebenstest bestimmt. Die Bestimmung der relativen Zellzahl erfolgte 19 Tage nach Transfektion (p.T.) von LN-308_P Zellen und 9 Tage p.T von LN-308_R Zellen (A), 8 Tage p.T. von LNT-229 Zellen (B) und 10 Tage p.T von LN-18 Zellen (C). Die Auswertung des Zellüberlebens erfolgte, in dem das Zellüberleben von Mimic- bzw. Mimic-NC-transfizierten, TMZ-unbehandelten Zellen (0 μ M TMZ) gleich 100 % gesetzt wurde. Im Verhältnis dazu wurde das Zellüberleben von TMZ-behandelten Zellen berechnet. LN-18_R Zellen wurden zwar transfiziert, überlebten aber nicht lange genug, um den Versuch auszuwerten.

Eine Transfektion mit *miR-138-5p* Mimic in LN-308_P führte zu einem erhöhten Zellüberleben nach Gabe von TMZ-Konzentrationen im Bereich 12,5 μM und 25 μM (Abb. 11A). In LN-18_P Zellen führte eine Transfektion mit *miR-138-5p* Mimic zu einem erhöhten Zellüberleben nach TMZ-Gabe von 62,5 μM , 125 μM und 250 μM (Abb. 11C). Anschließend wurde überprüft, ob die Zellen an Resistenz verlieren, wenn *miR-138-5p* mit einem spezifischen Inhibitor herunterreguliert wird.

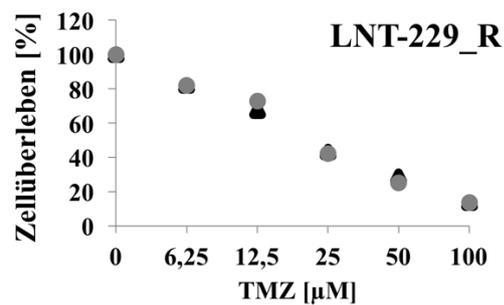
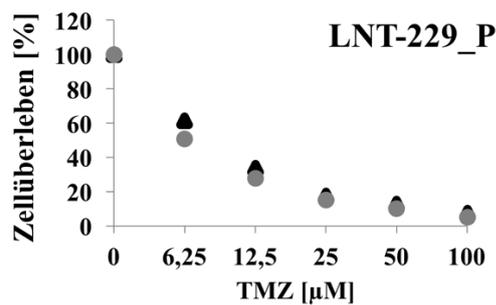
4.12 Auswirkung der Transfektion von Gliomzellen mit *miR-138-5p* Inhibitor-Molekülen auf die TMZ-Sensitivität

Um zu prüfen, ob eine Herunterregulation von *miR-138-5p* einen Einfluss auf die TMZ-Sensitivität von Gliomzellen hat, wurde die miRNA-Expression durch spezifische Inhibitoren herunterreguliert und die Gliomzellen mit ansteigenden TMZ-Konzentrationen behandelt. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz erfolgte mittels qPCR (Abb. 10D) sowie eines mit Dy547-fluoreszenzmarkierten Transfektionskontroll-Moleküls (*miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor Transfection Control with Dy547*), welches im Fluoreszenzmikroskop die transfizierten Zellen rot färbt.

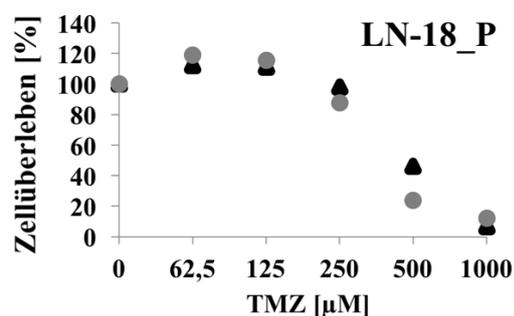
A



B



C



▲ miR-138-5p Inhibitor ● Inhibitor-NC

Abb. 12: TMZ-Sensitivität von LN-308, LNT-229 und LN-18 Gliomzellen nach Transfektion von *miR-138-5p* Inhibitor-Molekülen. A, B, C. Transfektion von LN-308_R Zellen (A), LNT-229_P und LNT-229_R Zellen (B) sowie LN-18_P Zellen (C) mit 80 nM *miR-138-5p* Inhibitor bzw. Inhibitor-NC. Die TMZ-Sensitivität der *miR-138-5p* Inhibitor- und Inhibitor-NC-transfizierten Zellen wurde mittels Zellüberlebenstest bestimmt. Die Bestimmung der relativen Zellzahl erfolgte 9 Tage nach Transfektion (p.T.) von LN-308 Zellen (A), 8 Tage p.T. von LNT-229 Zellen (B) und 10 Tage p.T. von LN-18 Zellen (C). LN-308_P und LN-18_R Zellen wurden zwar transfiziert, überlebten aber nicht lange genug, um den Versuch auszuwerten.

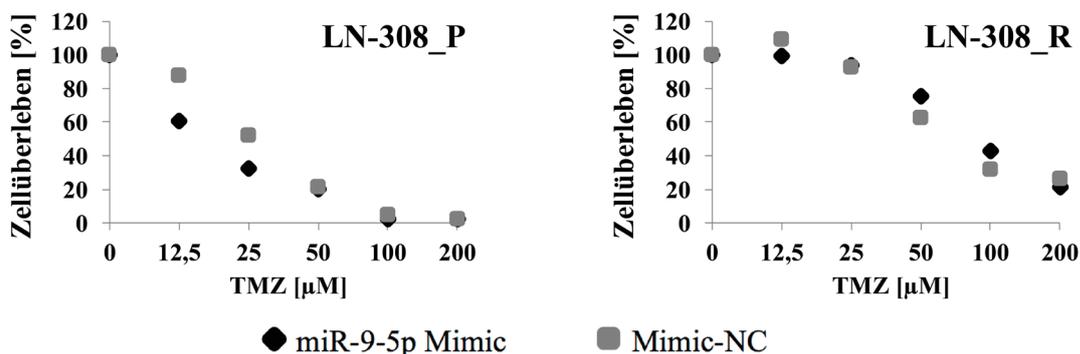
Die erzielten Daten (Abb. 12 A-C) zeigten keine wesentliche Beeinflussung der TMZ-Sensitivität durch die Herunterregulation von *miR-138-5p*. Anschließend wurde untersucht, ob

die Transfektion mit *miR-9-5p* Mimic- bzw. Inhibitor-Molekülen einen Einfluss auf die TMZ-Sensitivität von Gliomzellen hat.

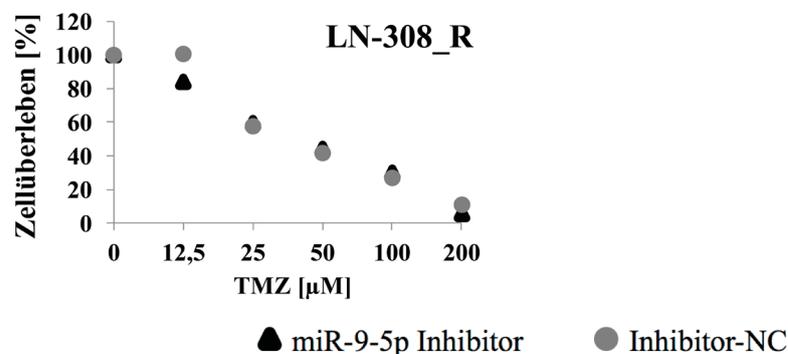
4.13 Auswirkung der Transfektion von Gliomzellen mit *miR-9-5p* Mimic- und Inhibitor-Molekülen auf die TMZ-Sensitivität

In RT-qPCR Untersuchungen ließ sich eine Herunterregulation von *miR-9-5p* in LN-308_R Gliomzellen und eine erhöhte Expression in LN-18_R nachweisen (Tabelle 15). Um die Rolle einer Modulation von *miR-9-5p* auf die TMZ-Sensitivität zu untersuchen, wurden sowohl die parentalen als auch die TMZ-resistenten drei Zelllinien mit *miR-9-5p* Mimic bzw. Inhibitor und den entsprechenden Kontrollen transfiziert (Abb. 13).

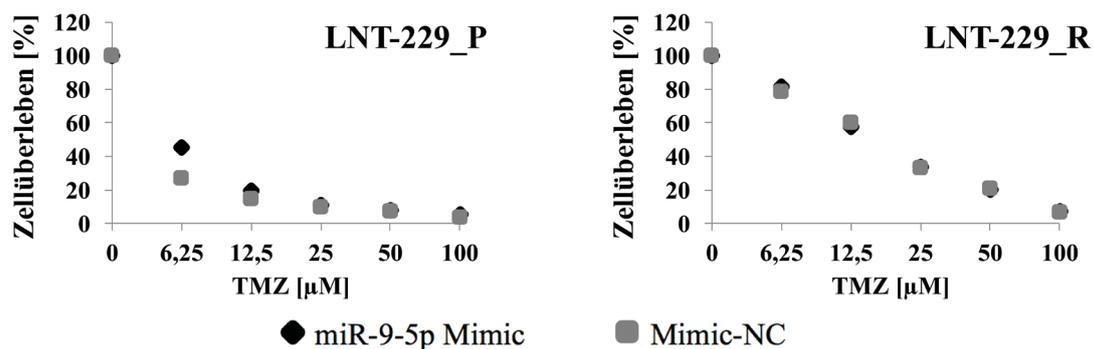
A1



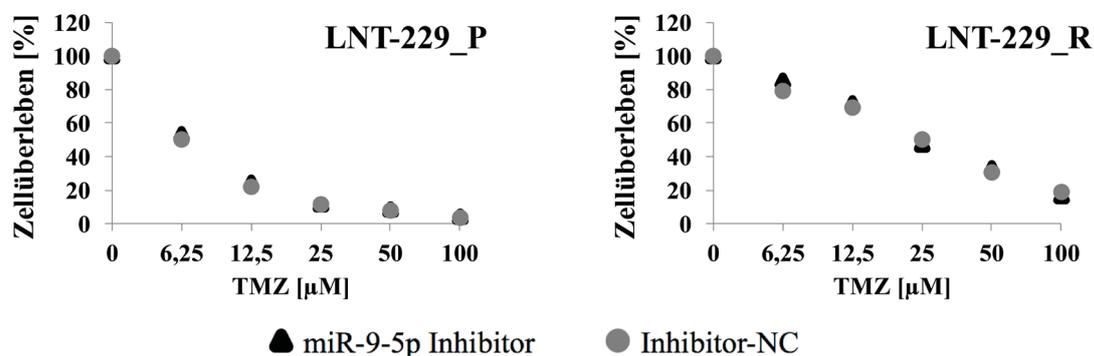
A2



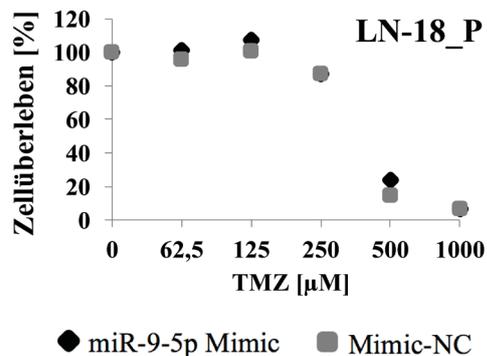
B1



B2



C1



C2

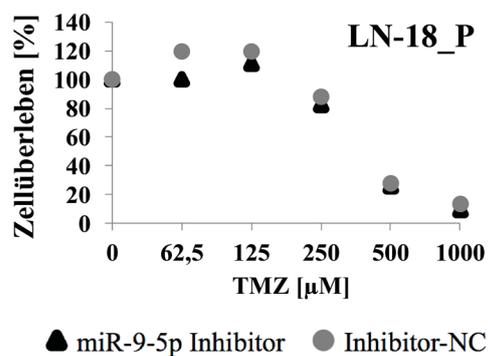


Abb. 13: TMZ-Sensitivität von LN-308, LNT-229 und LN-18 Gliomzellen nach Transfektion von *miR-9-5p* Mimic- und Inhibitor-Molekülen. A1, B1, C1. Transfektion von LN-308_P und LN-308_R Zellen (A1), LNT-229_P und LNT-229_R Zellen (B1) sowie LN-18_P Zellen (C1) mit 80 nM *miR-9-5p* Mimic bzw. Mimic-NC. A2, B2, C2. Transfektion von LN-308_R Zellen (A2), LNT-229_P und LNT-229_R Zellen (B2) sowie LN-18_P Zellen (C2) mit 80 nM *miR-9-5p* Inhibitor bzw. Inhibitor-NC. Die TMZ-Sensitivität der transfizierten Zellen wurde mittels Zellüberlebenstest bestimmt. Die Bestimmung der relativen Zellzahl erfolgte 12 Tage nach Transfektion (p.T.) von LN-308 Zellen (A1 und A2), 8 Tage p.T. von LNT-229 Zellen (B1 und B2) und 10 Tage p.T. von LN-18 Zellen (C1 und

C2). LN-18_R Zellen wurden zwar transfiziert, überlebten aber nicht lange genug, um den Versuch auszuwerten.

Nachdem zunächst die Transfektionseffizienz der mit *miR-9-5p* Mimic und Inhibitor transfizierten Zellen mittels RT-qPCR validiert und die Zellen erfolgreich transfiziert werden konnten (Abb. 10), zeigt die Abb. 13, dass sowohl eine Überexpression mit *miR-9-5p* Mimic, als auch eine Herunterregulation mit *miR-9-5p* Inhibitor-Molekülen keinen eindeutigen Effekt auf die TMZ-Sensitivität der verwendeten Gliomzellen hatte.

5 Diskussion

Das Glioblastom ist der bösartigste primäre Hirntumor im Erwachsenenalter und bisher gibt es keine kurativen Therapieansätze. Trotz kombinierter Behandlung aus Chemotherapie, Radiotherapie und Chirurgie sterben die Patienten im Durchschnitt innerhalb von 14-18 Monaten nach Diagnosestellung (Stupp *et al.*, 2005). Einer der Gründe für die kurze Überlebenszeit der Patienten ist die Entwicklung einer Resistenz gegenüber der Chemotherapie mit dem alkylierenden Wirkstoff Temozolomid (TMZ). Dabei sind unterschiedliche Mechanismen bekannt, die zu einer Resistenz gegenüber TMZ führen, wobei man zwischen einer bereits vorhanden Resistenz und einer induzierten Resistenz unterscheiden kann. Eine bereits vorhandene Resistenz kann bestehen, wenn der Promotor des Gens für das DNA-Reparaturenzym MGMT, welches das TMZ-induzierte mutagene O6-Alkylguanin-Addukt aus der DNA entfernt, in seiner unmethylierten, also aktiven Form, vorliegt. Dadurch wird die Wirkung von TMZ in den Gliomzellen aufgehoben, was zu einer primären Resistenz der Zellen gegenüber TMZ führt. In ca. 40% der Fälle liegt jedoch eine *MGMT*-Promotorhypermethylierung vor, sodass das MGMT-Reparatursystem inaktiv ist und Zellen auf TMZ sensitiv reagieren können (Hegi *et al.*, 2005; Parker *et al.*, 2015). Eine induzierte Resistenz konnte in Glioblastom-Rezidiven nach einer TMZ-Behandlung nachgewiesen werden. Felsberg *et al.* konnten eine Abnahme der Expression von DNA-Mismatch-Reparaturproteinen (MMR) in Rezidiven nachweisen (Felsberg *et al.*, 2011). Andere Autoren fanden, dass die Therapie mit TMZ neue MMR-Mutationen in Glioblastom-Rezidiven, wie z.B. im MMR-Gen *MSH6* induziert und es somit zu erneutem Tumorwachstum und Fortschreiten der Erkrankung kommen kann. MMR-Proteine erkennen Fehlbindungen zwischen gegenüberliegenden Basenpaaren eines DNA-Strangs sowie IDLs, die während der DNA-Replikation entstehen können. Ein defizientes MMR-System resultiert unabhängig vom MGMT-Status in einer erhöhten Resistenz gegenüber TMZ.

Neuere Studien zeigen, dass miRNAs in verschiedenen Tumorarten einen Beitrag zur Resistenzentwicklung gegenüber alkylierenden Therapeutika leisten können (Lee *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2014; She *et al.*, 2014). Ziel dieser Doktorarbeit war es, solche miRNAs zu identifizieren, die eine Rolle in der erworbenen bzw. induzierten Therapieresistenz von Gliomzellen gegen TMZ spielen und durch eine gezielte Deregulation derselben miRNAs die Resistenz gegenüber TMZ zu modulieren.

Mittels Microarray-basierter miRNA-Expressionsanalyse konnten solche miRNAs identifiziert werden, die zwischen TMZ-resistenten und parentalen Gliomzellen differenziell exprimiert

waren. Der Unterschied zu den bisherigen Studien war die anschließende Expressionsanalyse der miRNAs mittels qPCR in Gewebeproben von Patienten mit primärem Glioblastom vor und nach der Therapie mit TMZ. Insgesamt wurde mittels qPCR das Expressionsniveau von 12 miRNAs (*miR-181d-5p*, *miR-192-5p*, *miR-194-5p*, *miR-497-5p*, *miR-9-5p*, *miR-195-5p*, *miR-210-5p*, *miR-29a-5p*, *miR-185-5p*, *miR-138-5p*, *miR-939-5p* und *miR-1909*) in den Gliomzelllinien validiert. Um herauszufinden, welche miRNAs passagenunabhängig differenziell exprimiert sind, erfolgte die Validierung in den Gliomzelllinien LN-18, LNT-229 und LN-308 in zwei verschiedenen Passagen: die Screening-Probe für die Microarray-basierte miRNA-Expressionsanalyse und zusätzlich in drei technischen Replikaten einer Passage von LN-308. Die miRNAs *miR-192-5p*, *miR-138-5p* und *miR-9-5p* wurden dabei als interessante Kandidaten identifiziert, da diese differenziell in den Gliomzelllinien sowie den Tumorkulturen exprimiert vorlagen. Mittels Zellüberlebenstest sollte überprüft werden, ob die miRNAs in der Lage sind, die Chemoresistenz gegenüber TMZ zu verstärken bzw. abzuschwächen. Dazu wurden die Zellen mit den jeweiligen miRNAs transfiziert und 24 Stunden später mit TMZ behandelt. In einem Zeitraum von bis zu 19 Tagen wurde das Zellwachstum überwacht und mit Kontroll-transfizierten Zellen verglichen. Besonders interessant war die Resistenzentstehung in der Zelllinie LN-308, da der Resistenzmechanismus bisher nicht bekannt war, während in LN-18 und LNT-229 der Mechanismus bereits näher beschrieben wurde (Happold *et al.*, 2012). LN-18 Zellen weisen eine primäre Resistenz gegenüber TMZ auf, da hier der *MGMT*-Promotor in seiner unmethylierten Form vorliegt. Durch repetitive TMZ-Exposition der LN-18 Zellen konnte das Expressionsniveau von *MGMT* noch weiter gesteigert werden, wodurch die Resistenz der Zellen gegenüber TMZ weiter zugenommen und der IC50-Wert sich um den Faktor 10 erhöht hat (Happold *et al.*, 2012). In LNT-229 Gliomzellen wird *MGMT* nicht exprimiert und auch durch repetitive TMZ-Gabe erfolgte keine induzierte *MGMT* Expression. Stattdessen konnte man im resistenten Subtyp von LNT-229 eine Herunterregulation von MMR-Proteinen (MSH2, MSH6 und PMS2) nachweisen (Happold *et al.*, 2012).

In dieser Arbeit konnten durch Microarray-basierte miRNA-Expressionsanalyse neue miRNA-Kandidaten identifiziert werden, die zwischen TMZ-resistenten und parentalen Gliomzellen differenziell exprimiert sind. Studien hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und Genauigkeit Microarray-basierter Expressionsanalysen zeigen jedoch, dass diese teilweise inkonsistente Daten liefern sowie Diskrepanzen in der Ermittlung des *fold change* aufweisen können (Kothapalli *et al.*, 2002). Daher ist es sinnvoll und notwendig, die identifizierten miRNAs mittels einer unabhängigen Methode wie der qPCR zu validieren, da durch die beschriebenen Fluoreszenz-Detektionsmethoden die Menge des PCR-Produkts und die relative Expression

genauer detektiert werden kann. So konnten von den vorher 12 in den Microarrayanalysen identifizierten miRNAs lediglich fünf als differenziell zwischen parentalen und resistenten Glioblastomzelllinien exprimierte miRNAs mittels qPCR validiert werden: *miR-192-5p*, *miR-138-5p*, *miR-9-5p*, *miR-181d-5p* und *miR-210-5p*. Zu Beginn der Forschungsarbeit gab es keine Studie, die einen Zusammenhang zwischen diesen aufgeführten miRNAs und dem Glioblastom bzw. einer TMZ-Resistenz herstellten. In anderen Tumorentitäten wurden diese miRNAs bereits beschrieben und ein Zusammenhang zwischen einer Deregulation der jeweiligen miRNA und Zellwachstum oder Resistenz gegenüber der Chemotherapie nachgewiesen. In den folgenden Kapiteln sind Studien zu den identifizierten miRNAs aufgeführt, in Bezug auf die Rolle der jeweiligen miRNA in der Resistenzentstehung und Zellwachstum in anderen Tumorentitäten sowie im Glioblastom. Interessanterweise kann, abhängig von der Art des Tumors, ein und dieselbe miRNA eine Rolle als Tumorsuppressor oder als Oncomir (krebsfördernde miRNA) entfalten.

5.1 Verstärkte Expression von *miR-192-5p* in Rezidivglioblastomen und in TMZ-resistenten LNT-229 und LN-18 Gliomzelllinien

Mittels microRNA-Microarrays wurde das Expressionsprofil von miRNAs in parentalen und TMZ-resistenten Zellen der drei Glioblastomzelllinien LNT-229, LN-308 und LN-18 untersucht, wobei *miR-192-5p* im Paarvergleich für die Linien LN-308 und LNT-229 sowie im Gruppenvergleich aller drei Linien insgesamt differenziell exprimiert war. Bisherige Untersuchungen zu *miR-192-5p* deuten auf eine mögliche Rolle in der Chemotherapieresistenz von Tumorzellen hin. Im Mammakarzinom trägt *miR-192-5p* beispielsweise durch die Herunterregulation des Estrogenreceptor- α zur Tamoxifen-Resistenz bei. Eine Inhibierung von *miR-192-5p* erhöhte die Sensitivität gegenüber der Chemotherapie mit Tamoxifen (Kim *et al.*, 2016). Eine andere Arbeit berichtete über eine durch *miR-192* vermittelte Erhöhung der Resistenz gegenüber Fluorouracil in gastrointestintinalen Tumorzellen durch Hemmung der Zellproliferation (Boni *et al.*, 2010).

Bisher gibt es keine Studie zu *miR-192-5p* im Zusammenhang mit Gliomen oder einer Rolle in der TMZ-Resistenz. In dieser Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass *miR-192-5p* in sieben von zehn Rezidivglioblastomen (im Vergleich zu den zugehörigen Primärtumoren) und in TMZ-resistenten Gliomzelllinien LNT-229 und LN-18 (im Vergleich zu den entsprechenden

Parentalen Zellen) signifikant überexprimiert ist. Die funktionellen Untersuchungen von *miR-192-5p* wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Weller, Klinik für Neurologie am Universitätsspital Zürich durchgeführt. Nach Validierung der differentiellen Expression der *miR-192-5p* in *in vivo* Tumorproben und *in vitro* Gliomzelllinien wurden die Gliomzelllinien LNT-229, LN-308 und LN-18 mit *miR-192-5p* Mimic erfolgreich transfiziert. Eine Herunterregulation konnte nach Transfektion mit *miR-192-5p* Inhibitor-Molekülen ebenfalls erreicht werden. Sowohl eine Überexpression als auch eine Herunterregulation der Expression von *miR-192-5p* zeigte allerdings keinen Effekt auf die Resistenz der Gliomzellen gegenüber TMZ (Dr. N. Stojcheva, unpublizierte Ergebnisse). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die *miR-192-5p* Expression zwar mit der Tumorprogression unter Therapie zunimmt, aber *miR-192-5p* andere Funktionen zur Sicherung des Überlebens von Gliomzellen erfüllt, ohne eine Resistenz gegenüber TMZ zu vermitteln.

5.2 Verstärkte Expression von *miR-138-5p* in Rezidivglioblastomen und TMZ-resistenten LN-308 Gliomzelllinien

MiR-138-5p konnte ebenfalls durch Microarray-Analysen als differentiell exprimierte miRNA im Gruppenvergleich zwischen den parentalen und TMZ-resistenten Gliomzelllinien identifiziert werden. *MiR-138-5p* wurde bereits in anderen Tumorentitäten untersucht und eine Rolle als Tumorsuppressor beschrieben. Im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) ist *miR-138-5p* in Adriamycin-resistenten Zellen herunterreguliert und eine Reexpression der *miR-138-5p* führte zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Adriamycin (Jin *et al.*, 2016). Ebenso kann eine Reexpression von *miR-138-5p* die Gefitinib- (Gao *et al.*, 2014) sowie Cisplatin-Resistenz in NSCLC vermindern (Wang *et al.*, 2011). Im Osteosarkom ist *miR-138-5p* in Zelllinien und Zellgeweben herunterreguliert (Zhu *et al.*, 2016). Wird *miR-138-5p* überexprimiert, so fungiert sie als Tumorsuppressor, der an *Enhancer of zeste homolog 2* (EZH2), einem Enzym, das u.a. für die DNA-Methylierung verantwortlich ist, bindet. Dadurch wird die Chemosensitivität gegenüber Cisplatin erhöht und somit die Apoptose induziert (Zhu *et al.*, 2016). Im Prostatakarzinom erhöht *miR-138-5p* die Sensitivität der Krebszellen gegenüber Docetaxel, indem es das Kindlin-2 Protein hemmt (Sossey-Alaoui *et al.*, 2016). Im Glioblastom-Mausmodell konnte ebenfalls die Rolle als Tumorsuppressor gezeigt werden: eine Hochregulation der *miR-138-5p* in CD4-positive T-Zellen, führte zu einer

Tumorregression (Wei *et al.*, 2016). Eine andere Studie an Gliomzellen belegte die Suppression der Tumorigenität durch Inhibierung des EZH2-CDK4/6-pRb-E2F1 Signalweges durch Hochregulation der *miR-138-5p* (Qiu *et al.*, 2013). Chan *et al.* konnten *miR-138-5p* als Oncomir identifizieren, in dem sie diese im Zusammenhang mit Gliomen untersucht und gezeigt haben, dass Glioblastomstammzellen durch die Inhibierung dieser miRNA in ihrer Tumorigenität beeinflusst werden (Chan *et al.*, 2012). Keine Studie hat bisher über *miR-138-5p* im Zusammenhang mit der Chemotherapieresistenz gegenüber TMZ berichtet. In unserer Studie konnten wir zum ersten Mal einen direkten Zusammenhang zwischen der Überexpression von *miR-138-5p* und einer erhöhten TMZ-Resistenz in Gliomzelllinien herstellen und zeigen, dass die *miR-138-5p* Expression in rezidierten Glioblastomen nach Radiochemotherapie verstärkt ist, d.h. in neun von zehn Rezidivtumoren zeigte sich eine höhere *miR-138-5p*-Expression im Vergleich zu den zugehörigen Primärtumoren. Um zu prüfen, ob durch eine Hochregulation der *miR-138-5p* die TMZ-Resistenz in glialen Zelllinien zunimmt, wurde diese miRNA in den Gliomzelllinien durch transiente Transfection von *miR-138-5p*-Mimics überexprimiert. Die Modulation der Expression der *miR-138-5p* mit entsprechenden Mimics hat in dieser Studie lediglich zu einer geringen Überexpression der selbigen miRNA in den untersuchten Gliomzelllinien geführt. In weiterführenden Experimenten ist es Frau Dr. Stojcheva aus der Arbeitsgruppe von Prof. Weller in Zürich dann gelungen, *miR-138-5p* mit entsprechenden Mimics in Gliomzellen erfolgreich überzuexprimieren (Stojcheva *et al.*, 2016). Sie hat dabei das gleiche Transfektionsreagenz benutzt, jedoch niedrigere Konzentration der Mimics (50 nM) im Vergleich zu der vorliegenden Studie (80 nM) verwendet. Da in der vorliegenden Studie also ausreichende Konzentrationen an Mimics verwendet wurden, war die Ursache für die nur geringe Überexpression in den eigenen Experimenten vermutlich eine unzureichende Transfektionseffizienz (vgl. Abb. 10).

Im Zellüberlebenstest konnte eine Erhöhung der TMZ-Resistenz in parental LN-308 und LN-18 Zellen nach der erfolgreichen Transfektion mit *miR-138-5p*-Mimics festgestellt werden (Stojcheva *et al.*, 2016). Dieses Ergebnis passt zu den eigenen Ergebnissen aus der qPCR-Validierung, da *miR-138-5p* in TMZ-resistenten LN-308 und LN-18 Gliomzellen verstärkt exprimiert war. Gleichzeitig ist das Ergebnis konträr zu der in anderen Tumorentitäten beschriebenen Rolle der *miR-138-5p* in der Resistenzentwicklung, denn dort wurde diese miRNA in Adriamycin- bzw. Cisplatin-resistenten Zellen als vermindert exprimiert beschrieben und durch eine Überexpression konnten die Zellen wieder sensitiver gegenüber der Chemotherapie gemacht werden (Jin *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2016). Auch wenn in den eigenen Arbeiten die Rolle der *miR-138-5p* in Bezug auf Tumorregression und Tumorigenität nicht

untersucht wurde, sind die eigenen Ergebnis ebenfalls konträr zu den von Qiu *et al.* sowie Wei *et al.* beschriebenen Studien in Gliomzellen, die zeigen, dass *miR-138-5p* in GL261-Gliomzellen der Maus sowie in humanen U87MG- und U251MG-Gliomzelllinien im Vergleich zur Kontrolle weniger stark exprimiert ist und eine Überexpression dieser miRNA die Tumorigenität vermindert bzw. zur Tumorregression führt (Qiu *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2016). Interessanter Weise zeigt die Studie von Wei *et al.* durch *miR-138* einen indirekten immunologischen Effekt, aber keinen direkten tumorhemmenden Effekt, auf das Wachstum von Gliomen im Mausmodell. So konnte im immunkompetenten Mausmodell durch Behandlung mit *miR-138* eine Tumorregression festgestellt und das mediane Überleben verlängert werden, wohingegen in immun-inkompetenten Mauszellen, welche keine CD4 und CD8 positive T-Zellen in ausreichenden Menge vorliegen hatten, die Überexpression mit *miR-138* keinen Effekt auf den Tumor hatte (Wei *et al.*, 2016).

Andererseits gibt es auch Arbeiten, die in Übereinstimmung mit eigenen Befunden eine onkogene (*pro-survival*) Funktion von *miR-138-5p* belegen: Chan *et al.* konnten in ihrer Studie *miR-138* als Oncomir identifizieren und zeigen, dass durch eine Inhibierung dieser miRNA die Tumorigenität und Tumorsphärenbildung vermindert wird (Chan *et al.*, 2012). Di Pascale *et al.* bauen ihre Studie auf den Ergebnissen von Chan *et al.* (2012) auf und konnten nachweisen, dass die *miR-138* Transkription durch das CCAAT/Enhancer-Binding-Protein β (C/EBP β) aktiviert und damit indirekt zur Tumorentwicklung beiträgt (Di Pascale *et al.*, 2018).

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die Expression von *miR-138-5p* mittels eines miRNA-spezifischen Inhibitors herunter zu regulieren. Dies hatte im Zellüberlebenstest jedoch keinen Effekt auf die TMZ-Resistenz. Ein Grund dafür könnte die ohnehin schon geringe basale Expression der *miR-138-5p* in Gliomzelllinien sein, sodass eine weitere Herunterregulation keine funktionelle Auswirkungen mehr hat (Stojcheva *et al.*, 2016). Schlußendlich konnte für LN-308 parentale Zellen gezeigt werden, dass *miR-138-5p* die Resistenz gegen TMZ noch weiter verstärken kann. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden nachfolgend von Frau Dr. Stojcheva am Universitätsspital Zürich weitere Untersuchungen durchgeführt, die letztlich nahelegten, dass *miR-138-5p* über die Herunterregulation des Bcl-2-interagierenden Proteins BIM mit nachvollgender Induktion von Autophagie das Überleben von Gliomzellen nach TMZ-Gabe verbessert und dadurch zur TMZ-Resistenzentstehung beitragen kann (Stojcheva *et al.*, 2016).

5.3 Verminderte Expression von *miR-9-5p* in TMZ-resistenten LN-308 Glioblastomzelllinie

MiR-9-5p wurde für funktionelle Untersuchungen ausgewählt, da die Expression in den Microarray-Analysen im Paarvergleich von TMZ-resistenten LNT-229 und LN-308 Zelllinien sowie im Gruppenvergleich der drei untersuchten parentalen und TMZ-resistenten Zelllinien vermindert exprimiert war.

MiR-9-5p fungiert je nach Tumorart entweder als Oncomir oder als Tumorsuppressor. Als Oncomir moduliert sie im Leberzellkarzinom die Expression von N-Acetylgalactosaminyltransferase und fördert damit die maligne Transformation (Liu et al. 2017). Im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom begünstigt *miR-9-5p* das Zellwachstum und kann durch Erlotinib, einen selektiven Inhibitor der Tyrosinkinase-Domäne des EGF-Rezeptors, runterreguliert werden, wodurch sich das Zellwachstum verlangsamen lässt (Chen et al., 2015). Als Tumorsuppressor spielt *miR-9-5p* im Multiplen Myelom eine Rolle in der Herunterregulierung von CD44, einem Glykoprotein, welches für die Therapieresistenz gegenüber Lenalidomid und Dexamethason verantwortlich ist, und trägt dazu bei, die Resistenz gegenüber diesen Medikamenten zu vermindern (Canella et al., 2015). Im Ovarialkarzinom ließ sich durch eine modulierte Überexpression von *miR-9-5p* die Resistenz gegenüber Paclitaxel vermindern (Li et al., 2015). Gleichzeitig zeigte eine andere Studie, dass *miR-9-5p* als Oncomir in der gleichen Tumorentität die Tumorgenese und Resistenz gegenüber Cisplatin erhöhen kann (Zhao et al., 2015). Zum Zeitpunkt des Forschungsbeginns dieser Arbeit gab es keine Studie, die *miR-9-5p* in Zusammenhang mit Gliomen oder einer TMZ-Resistenz untersucht hat. Neuere Studien zeigen, dass die *miR-9-5p* Expression zum einen durch Hypoxie induziert wird und zum anderen die Zelldichte sowie die Zellinvasion in Gliomen beeinflusst (Katakowski et al., 2016). Eine weitere Studie berichtete, dass eine *miR-9-5p*-Überexpression zur TMZ-Resistenz in den Glioblastomzelllinien U87MG und T98G durch die Inhibierung des Zielgens *PTCH1* beiträgt (Munoz et al., 2015).

In den eigenen Untersuchungen belegte die Validierung mittels qPCR eine erniedrigte Expression von *miR-9-5p* in TMZ resistenten LN-308 Gliomzellen und eine Überexpression in einer Passage der TMZ resistenten LN-18 Gliomzellen. Die Diskrepanz, warum die *miR-9-5p*-Expression nur in einer Passage der resistenten Gliomzellen LN-18 erhöht war, könnte darauf zurückgeführt werden, dass grundsätzlich die Expression einzelner miRNAs sich von Zellpassage zu Zellpassage ändern kann. Es würde auch zu dem Ergebnis passen, dass *miR-9-5p*

in den Microarray-Analysen in den resistenten LN-18 Gliomzellen zunächst nicht als differenziell exprimierte miRNA identifiziert wurde. Interessant ist auch, dass *miR-9-5p* in keiner Passage der Zelllinie LNT-229 differenziell exprimiert war. In qPCR-Untersuchungen an primären Glioblastomen und zugehörigen Rezidivtumoren, ließ sich eine differenzielle Expression von *miR-9-5p* nur in einem von sechs Tumorkomplexen nachweisen. In Zellkulturuntersuchungen ist es gelungen, die Expression der *miR-9-5p* zu modulieren. Durch *miR-9-5p*-Inhibitoren ließ sich eine deutliche Herunterregulation der Expression in Gliomzelllinien erreichen, was jedoch im Zellüberlebenstest keinen Effekt auf die TMZ-Resistenz zeigte. Durch Transfektion von *miR-9-5p*-Mimic konnte eine Überexpression der selbigen miRNA erreicht werden, die aber ebenfalls keinen Effekt auf die TMZ-Resistenz im Zellüberlebenstest zeigte. Diese Befunde sprechen dafür, dass *miR-9-5p* offensichtlich keine wesentliche Rolle für das Ansprechen von Gliomzellen auf TMZ spielt. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese berichteten Munoz *et al.*, dass eine deregulierte *miR-9* Expression keinen Einfluss auf die MGMT-Expression hat (Munoz *et al.*, 2016). In der TMZ-resistenten Gliomzelllinie LNT-229 sind die MMR-Gene herunterreguliert, jedoch ist bisher nicht untersucht worden, ob *miR-9-5p* einen Effekt auf die MMR-Genexpression haben könnte. In der TMZ-resistenten Gliomzelllinie LN-308 ist *miR-138-5p* überexprimiert und führt über die Herunterregulation von BIM zur Resistenzentstehung (Stojcheva *et al.*, 2016). Interessanterweise wurde in einer Studie zur Tibiaplateaufrakturen ein Zusammenhang zwischen der Expression von *miR-9* und BIM beschrieben. Demnach führt eine Unterexpression von *miR-9* zu einer Herunterregulation von BIM und vice versa eine Überexpression von *miR-9* führt über eine Unterdrückung der Ubiquitinierung von BIM, zu dessen Hochregulation und letztendlich zum Überleben von Osteoklasten (Wang *et al.*, 2014). Es wäre daher interessant zu überprüfen, ob *miR-9-5p* in Gliomzelllinien ebenfalls einen Effekt auf die BIM-Expression ausübt.

Das Ziel dieser Arbeit, d.h. die Identifizierung von differenziell exprimierten miRNAs in TMZ-resistenten Glioblastomzelllinien und Patiententumorproben vor und nach Radiochemotherapie mit TMZ konnte erreicht werden. Differenziell exprimierte miRNAs wurden anschließend mittels qPCR validiert. Die vielversprechendsten Kandidaten wurden für weitere funktionelle Untersuchungen ausgewählt, darunter *miR-138-5p*, die die Resistenzentstehung in LN-308 fördert. In auf den eigenen Arbeiten aufbauenden weiterführenden Untersuchungen zeigte sich, dass *miR-138-5p* über die Regulation von BIM und Autophagie das Ansprechen von Gliomzellen auf TMZ modulieren kann (Stojcheva *et al.*, 2016).

6 Literaturverzeichnis

Abbott, NJ (2013): Blood–brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 36 (3), S. 437–449.

Agarwal, S; Suri, V; Sharma, MC; Sarkar, C (2015): Therapy and progression--induced O6-methylguanine-DNA methyltransferase and mismatch repair alterations in recurrent glioblastoma multiforme. *Indian Journal of Cancer* 52 (4), S. 568-573.

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

Bertucci, A; Prasetyanto, EA; Septiadi, D; Manicardi, A; Brognara, E; Gambari, R; Corradini, R; De Cola, L (2015): Combined delivery of temozolomide and Anti-miR221 PNA using mesoporous silica nanoparticles induces apoptosis in resistant glioma cells. *Small* 11 (42), S. 5687-5695.

Bhayani, MK; Calin, GA; Lai, SY (2012): Functional relevance of miRNA* sequences in human disease. *Mutation Research* 731 (1-2), S. 14-19.

Bignami, M; Casorelli, I; Karran, P (2003): Mismatch repair and response to DNA-damaging antitumour therapies. *European Journal of Cancer* 39 (15), S. 2142–2149.

Boni, V; Bitarte, N; Cristobal, I; Zarate, R; Rodriguez, J; Maiello, E; Garcia-Foncillas, J; Bandres, E (2010): MiR-192/miR-215 influence 5-fluorouracil resistance through cell cycle-mediated mechanisms complementary to its post-transcriptional thymidilate synthase regulation. *Molecular Cancer Therapeutics* 9 (8). S. 2265-2275.

Botes, M; De Kwaadsteniet, M; Cloete, TE (2013): Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (1), S. 91–108.

Brandes, AA; Franceschi, E; Paccapelo, A; Tallini, G; De Biase, D; Ghimenton, C; Danieli, D; Zunarelli, E; Lanza, G; Silini, EM; Sturiale, C; Volpin, L; Servadei, F; Talacchi, A; Fioravanti, A; Foschini, MP; Bartolini, S; Pession, A; Ermani, M (2017): Role of *MGMT* methylation status at time of diagnosis and recurrence for patients with glioblastoma: Clinical implications. *Oncologist* 22 (4), S. 432-437.

Brognara, E; Fabbri, E; Montagner, G; Gasparello, J; Manicardi, A; Corradini, R; Bianchi, N; Finotti, A; Breveglieri, G; Borgatti, M; Lampronti, I; Milani, R; Dehecchi, MC; Cabrini, G; Gambari, R (2015): High levels of apoptosis are induced in human glioma cell lines by co-administration of peptide nucleic acids targeting miR-221 and miR-222. *International Journal of Oncology* 48 (3), S. 1029–1038.

Canella, A; Cordero-Nieves, H; Sborov, DW; Cascione, L; Radomska, HS; Smith, E; Stiff, A; Consiglio, J; Caserta, E; Rizzotto, L; Zanesi, N; Stefano, V; Kaur, B; Mo, X; Byrd, JC; Efebera, YA; Hofmeister, CC; Pichiorri, F (2015): HDAC inhibitor AR-42 decreases CD44 expression and sensitizes myeloma cells to lenalidomide. *Oncotarget* 6 (31), S. 31134-31150.

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

Chan, XH; Nama, S; Gopal, F; Rizk, P; Ramasamy S; Sundaram, G; Ow, GS; Ivshina, AV; Tanavde, V; Haybaeck, J; Kuznetsov, V; Sampath, P (2012): Targeting glioma stem cells by functional inhibition of a prosurvival oncomiR-138 in malignant gliomas. *Cell Reports* 2 (3), S. 591–602.

Chen, H; Li, X; Li, W; Zheng, H (2015): MiR-130a can predict response to temozolomide in patients with glioblastoma multiforme, independently of O6-methylguanine-DNA methyltransferase. *Journal of Translational Medicine* 13, S. 69.

Chen, W; Xu, XK; Li, JL; Kong, KK; Li, H; Chen, C; He, J; Wang, F; Li, P; Ge, XS; Li, FC (2017): MALAT1 is a prognostic factor in glioblastoma multiforme and induces chemoresistance to temozolomide through suppressing miR-203 and promoting thymidylate synthase expression. *Oncotarget* 8 (14), S. 22783-22799.

Chen, X; Zhu, L; Ma, Z; Sun, G; Luo, X; Li, M; Zhai, S; Li, P; Wang, X (2015): Oncogenic miR-9 is a target of erlotinib in NSCLCs. *Scientific Reports* 5, S. 17031.

Ciafrè, SA; Galardi, S; Mangiola, A; Ferracin, M; Liu, CG; Sabatino, G; Negrini, M; Maira, G; Croce, CM; Farace, MG (2005): Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334 (4), S. 1351-1358.

Corsten, MF; Miranda, R; Kasmieh, R; Krichevsky, AM; Weissleder, R; Shah, K (2007): MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas. *Cancer Research* 67 (19), S. 8994–9000.

Curtin, NJ; Wang, LZ; Yiakouvaki, A; Kyle, S; Arris, CA; Canan-Koch, S; Webber, SE; Durkacz, BW; Calvert, HA; Hostomsky, Z; Newell, DR (2004): Novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, AG14361, restores sensitivity to temozolomide in mismatch repair-deficient cells. *Clinical Cancer Research* 10 (3), S. 881–889.

Felekis, K; Touvana, E; Stefanou, Ch; Deltas, C (2010): MicroRNAs: A newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia* 14 (4), S. 236–240.

Felsberg, J; Thon, N; Eigenbrod, S; Hentschel, B; Sabel, MC; Westphal, M; Schackert, G; Kreth, FW; Pietsch, T; Löffler, M; Weller, M; Reifenberger, G; Tonn, JC; German Glioma Network (2011): Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas. *International Journal of Cancer* 129 (3), S. 659-670.

Franken, NA; Rodermond, HM; Stap, J; Haveman, J; van Bree, C (2006): Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols* 1 (5), S. 2315-2319.

Gao, YT; Chen, XB; Liu, HL (2016): Up-regulation of miR-370-3p restores glioblastoma multiforme sensitivity to temozolomide by influencing MGMT expression. *Scientific Reports* 6. S. 32972.

Gao, Y; Fan, X; Li, W; Ping, W; Deng, Y; Fu, X (2014): MiR-138-5p reverses gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cells via negatively regulating G protein-coupled receptor 124. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446 (1), S. 179–186.

Gautier, L; Cope, L; Bolstad, BM; Irizarry, RA (2004): Affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 20 (3), S. 307–315.

Gottesman, MM; Fojo, T; Bates, SE (2002): Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer* 2 (1), S. 48–58.

Grombacher, T; Mitra, S; Kaina, B (1996): Induction of the alkyltransferase (MGMT) gene by DNA damaging agents and the glucocorticoid dexamethasone and comparison with the response of base excision repair genes. *Carcinogenesis* 17 (11), S. 2329–2336.

Haemmig, S; Baumgartner, U; Glück, A; Zbinden, S; Tschan, MP; Kappeler, A; Mariani, L; Vajtai, I; Vassella, E (2014): MiR-125b controls apoptosis and temozolomide resistance by targeting TNFAIP3 and NKIRAS2 in glioblastomas. *Cell Death and Disease* 5, S. e1279.

Han, J; Chen, Q (2015): MiR-16 modulate temozolomide resistance by regulating BCL-2 in human glioma cells. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8 (10), S. 12698–12707.

Happold, C; Roth, P; Wick, W; Schmidt, N; Florea, AM; Silginer, M; Reifenberger, G; Weller, M (2012): Distinct molecular mechanisms of acquired resistance to temozolomide in glioblastoma cells. *Journal of Neurochemistry* 122 (2), S. 444–455.

Hegi, ME; Diserens, AC; Gorlia, T; Hamou, MF; de Tribolet, N; Weller, M; Kros, JM; Hainfellner, JA; Mason, W; Mariani, L; Bromberg, JE; Hau, P; Mirimanoff, RO; Cairncross, JG; Janzer, RC; Stupp, R (2005): MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England journal of medicine* 352 (10), S. 997–1003.

Hummel, R; Hussey, DJ; Haier, J (2010): MicroRNAs: Predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumour types. *European Journal of Cancer*, 46 (2), S. 298–311.

Jin, Z; Guan, L; Song, Y; Xiang, GM; Chen, SX; Gao, B (2016): MicroRNA-138 regulates chemoresistance in human non-small cell lung cancer via epithelial mesenchymal transition. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 20 (6), S. 1080–1086.

Jiricny, J; Nyström-Lahti, M (2000): Mismatch repair defects in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development* 10 (2), S. 157–161.

Johansson, G; Andersson, U; Melin, B (2016): Recent developments in brain tumor predisposing syndromes. *Acta Oncologica* 55 (4), S. 401–411.

Karsy, M.; Neil, JA; Guan, J; Mahan, MA; Colman, H; Jensen, RL (2015): A practical review of prognostic correlations of molecular biomarkers in glioblastoma. *Neurosurgical Focus* 38 (3), S. E4.

Katakowski, M; Charteris, N; Chopp, M; Khain, E (2016): Density-dependent regulation of glioma cell proliferation and invasion mediated by miR-9. *Cancer Microenvironment : Official Journal of the International Cancer Microenvironment Society* 9 (2–3), S. 149–159.

Kim, YS; Park, SJ; Lee, YS; Kong, HK; Park, JH. (2016): MiRNAs involved in LY6K and estrogen receptor α contribute to tamoxifen-susceptibility in breast cancer. *Oncotarget* 7 (27). S. 42261-42273.

Kothapalli, R; Yoder, SJ; Mane, S; Loughran, TP Jr (2002): Microarray results: how accurate are they?. 3, S. 1–10.

Kouri, FM; Ritner, C; Stegh, AH (2015): MiRNA-182 and the regulation of the glioblastoma phenotype - toward miRNA-based precision therapeutics. *Cell Cycle* 14 (24). S. 3794-3800.

- Lan, J; Xue, Y; Chen, H; Zhao, S; Wu, Z; Fang, J; Han, C; Lou, M (2014): Hypoxia-induced miR-497 decreases glioma cell sensitivity to TMZ by inhibiting apoptosis. *FEBS Letters*, 588 (18), S. 3333–3339.
- Lee, D; Sun, S; Zhang, XQ; Zhang, PD; Ho, AS; Kiang, KM; Fung, CF; Lui, WM; Leung, GK (2015): MicroRNA-210 and endoplasmic reticulum chaperones in the regulation of chemoresistance in glioblastoma. *Journal of Cancer* 6 (3), S. 227–232.
- Lee, Y; Kim, M; Han, J; Yeom, KH; Lee, S; Baek, SH; Kim, NV (2004): MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal* 23 (20), S. 4051-4060.
- Li, X; Pan, Q; Wan, X; Mao, Y; Lu, W; Xie, X; Cheng, X (2015): Methylation-associated Has-miR-9 deregulation in paclitaxel- resistant epithelial ovarian carcinoma. *BMC Cancer* 15. S. 509.
- Lim, A; Li, BF (1996): The nuclear targeting and nuclear retention properties of a human DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase are both required for its nuclear localization: the possible implications. *The EMBO Journal* 15 (15), S. 4050–4060.
- Liu, Y; Liu, H; Yang, L; Wu, Q; Liu, W; Fu, Q; Zhang, W; Zhang, H; Xu, J; Gu, J (2017): Loss of N-acetylgalactosaminyltransferase-4 orchestrates oncogenic microRNA-9 in hepatocellular carcinoma. *The Journal of Biological Chemistry* 292 (8), S. 3186-3200.
- Livak, KJ; Schmittgen, TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25 (4), S. 402–408.
- Louis, DN; Ohgaki, H; Wiestler, OD; Cavenee, WK; Burger, PC; Jouvet, A; Scheithauer, BW; Kleihues, P. (2007): The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica* 114 (2), S. 97-109.
- Louis, DN; Perry, A; Reifenberger, G; von Deimling, A; Figarella-Branger, D; Cavenee, WK; Ohgaki, H; Wiestler, OD; Kleihues, P; Ellison, DW (2016): The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* 131 (6), S. 803–820.
- Hartz, AM; Bauer, B (2011): ABC Transporters in the CNS – An Inventory. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12 (4), S. 656–673.
- Minniti, G; Muni, R; Lanzetta, G; Marchetti, P; Enrici, RM (2009): Chemotherapy for glioblastoma: Current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents. *Anticancer Research* 29(12), S. 5171–5184.
- Mitra, S (2007): MGMT: A personal perspective. *DNA Repair (Amst)* 6 (8), S. 1064-1070.
- Mojas, N; Lopes, M; Jiricny, J (2007): Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA. *Genes & Development* 21 (24), S. 3342–3355.
- Møller, HG; Rasmussen, AP; Andersen, HH; Johnsen, KB; Henriksen, M; Duroux, M (2013): A systematic review of microRNA in glioblastoma multiforme: Micro-modulators in the mesenchymal mode of migration and invasion. *Molecular Neurobiology* 47 (1). S. 131-144.
- Munoz, JL; Rodriguez-Cruz, V; Ramkissoon, SH; Ligon, KL; Greco, SJ; Ramehswar, P (2015): Temozolomide resistance in glioblastoma occurs by miRNA-9-targeted PTCH1, independent of sonic hedgehog level. *Oncotarget* 6 (2), S. 1190–1201.

- Munoz, JL; Rodriguez-Cruz, V; Rameshwar, P (2016): High expression of miR-9 in CD133+ glioblastoma cells in chemoresistance to temozolomide. *Journal of Cancer Stem Cell Research* 3, S. e1003.
- Natarajan, AT; Vermeulen, S; Darroudi, F; Valentine, MB; Brent, TP; Mitra, S; Tano, K (1992): Chromosomal localization of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene by in situ hybridization. *Mutagenesis* 7 (1), S. 83–85.
- Newlands, ES; Blackledge, GR; Slack, JA; Rustin, GJ; Smith, DB; Stuart, NS; Quarterman, CP; Hoffman, R; Stevens, MF; Brampton, MH *et al.* (1992): Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045: M&B 39831: NSC 362856). *British Journal of Cancer* 65 (2), S. 287–291.
- Ohgaki, H; Kleihues, P (2005): Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 64 (6), S. 479–489.
- Ohgaki, H; Kleihues, P (2013): The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical Cancer Research* 19 (4), S. 764-772.
- Orang, AV; Safaralizadeh, R; Kazemzadeh-Bavili, M (2014): Mechanisms of miRNA-mediated gene regulation from common downregulation to mRNA-specific upregulation. *International Journal of Genomics*, Epub 2014.
- Ostrom, QT; Gittleman, H; Liao, P; Rouse, C; Chen, Y; Dowling, J; Wolinski, Y; Kruchko, C; Barnholtz-Sloan, J (2014): CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro-Oncology* 16 (Suppl 4), S. iv1-63.
- Parker, NR; Khong, P; Parkinson, JF; Howell, VM; Wheeler, HR (2015): Molecular heterogeneity in glioblastoma: potential clinical implications. *Frontiers in Oncology* 5 (55).
- Di Pascale, F; Nama, S; Muhuri, M; Quah, S; Ismail, HM; Chan, XHD; Sundaram, GM; Ramalingam, R; Burke, B; Sampath, P (2018): C/EBP β mediates RNA polymerase III-driven transcription of oncomiR-138 in malignant gliomas. *Nucleic Acids Research* 46 (1), S. 336–349.
- Qian, X; Ren, Y; Shi, Z; Long, L; Pu, Peiyu; Sheng, J; Yuan, X; Kang, Chunsheng (2012): Sequence-dependent synergistic inhibition of human glioma cell lines by combined Temozolomide and miR-21 inhibitor gene therapy. *Molecular Pharmaceutics* 9 (9), S. 2636-2645.
- Qiu, S; Huang, D; Yin, D; Li, F; Li, X; Kung, HF; Peng, Y (2013): Suppression of tumorigenicity by microRNA-138 through inhibition of EZH2-CDK4 / 6-pRb-E2F1 signal loop in glioblastoma multiforme', *Biochimica et Biophysica Acta* 1832 (10), S. 1697–1707.
- Ratnam, K; Low, JA (2007): Current development of clinical inhibitors of Poly(ADP-Ribose) polymerase in oncology. *Clinical Cancer Research* 13 (5), S. 1383–1388.
- Ricard, D; Idhah, A; Ducray, F; Lahutte, M; Hoang-Xuan, K; Delattre, JY (2012): Primary brain tumours in adults. *Lancet* 379 (9830), S. 1984–1996.
- Shah, N; Lin, B; Silbenaller, Z; Ryken, T; Lee, H; Yoon, JG; Rostad, S; Foltz, G (2011): Comprehensive analysis of MGMT promoter methylation: Correlation with MGMT expression and clinical response in GBM. *PLoS ONE* 6 (1). S. e16146.

She, X; Yu, Z; Cui, Y; Lei, Q; Wang, Z; Xu, G; Xiang, J; Wu, M; Li, G (2014): MiR-128 and miR-149 enhance the chemosensitivity of temozolomide by Rap1B-mediated cytoskeletal remodeling in glioblastoma. *Oncology Reports* 32 (3), S. 957–964.

She, X; Yu, Z; Cui, Y; Lei, Q; Wang, Z; Xu, G; Luo, Z; Li, G; Wu, M (2014): MiR-181 subunits enhance the chemosensitivity of temozolomide by Rap1B-mediated cytoskeleton remodeling in glioblastoma cells. *Medical Oncology* 31 (4), S. 892.

Shi, L; Chen, J; Yang, J; Pan, T; Zhang, S; Wang, Z (2010): MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity. *Brain Research* 1352. S. 255-264.

Slaby, O; Lakomy, R; Fadrus, P; Hrstka, R; Kren, L; Lzicarova E; Smrcka, M; Svoboda, M; Dolezalova, H; Novakova, J; Valik, D; Vyzula, R; Michalek, J (2010): MicroRNA-181 family predicts response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide in glioblastoma patients. *Neoplasma* 57 (3), S. 264-269.

Smyth, GK; Michaud, J; Scott, HS (2005): Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 21 (9), S. 2067–2075.

Sossey-Alaoui, K; Plow, EF (2016): MiR-138-mediated regulation of KINDLIN-2 expression modulates sensitivity to chemotherapeutics. *Molecular Cancer Research* 14 (2), S. 228–238.

Srivenugopal, KS; Yuan, XH; Friedman, HS; Ali-Osman, F (1996): Ubiquitination-dependent proteolysis of O⁶-Methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O⁶-Benzylguanine or 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochemistry* 35 (4), S. 1328–1334.

Stavrovskaya, AA; Shushanov, SS; Rybalkina, EY (2016): Problems of glioblastoma multiforme drug resistance. *Biochemistry* 81 (2), S. 91–100.

Stojcheva, N; Schechtmann, G; Sass, S; Roth, P; Florea, AM; Stefanski, A; Stühler, K; Wolter, M; Müller, NS; Theis, FJ; Weller, M; Reifenberger, G; Happend, C (2016): MicroRNA-138 promotes acquired alkylator resistance in glioblastoma by targeting the Bcl-2-interacting mediator BIM. *Oncotarget* 7 (11). S. 12937-12950.

Stupp, R; Mason, WP; van den Bent, MJ; Weller, M; Fisher, B; Taphoorn, MJ; Belanger, K; Brandes, AA; Marosi, C; Bogdahn, U; Curschmann, J; Janzer, RC; Ludwin, SK; Gorlia, T; Allgeier, A; Lacombe, D; Cairncross, JG; Eisenhauer, E; Mirimanoff, RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005): Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* 352 (10), S. 987-996.

Stupp, R; Hegi, ME; Mason, WP; van den Bent, MJ; Taphoorn, MJ; Janzer, RC; Ludwin, SK; Allgeier, A; Fisher, B; Belanger, K; Hau, P; Brandes, AA; Gijtenbeek, J; Marosi, C; Vecht, CJ; Mokhtari, K; Wesseling, P; Villa, S; Eisenhauer, E; Gorlia, T; Weller, M; Lacombe, D; Cairncross, JG; Mirimanoff, RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (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. *The Lancet Oncology* 10 (5), S. 459–466.

Tang, G; Wu, J; Xiao, G; Huo, L (2014): MiR-203 sensitizes glioma cells to temozolomide and

inhibits glioma cell invasion by targeting E2F3. *Molecular Medicine Reports* 11 (4), S. 2838–2844.

Tano, K; Shiota, S; Collier, J; Foote, RS; Mitra, S (1990): Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6-alkylguanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (2), S. 686–690.

Tsang, LL; Farmer, PB; Gescher, A; Slack, JA (1990): Characterisation of urinary metabolites of temozolomide in humans and mice and evaluation of their cytotoxicity. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 26 (6), S. 429–436.

Ujifuku, K; Mitsutake, N; Takakura, S; Matsuse, M; Saenko, V; Suzuki, K; Hayashi, K; Matsuo, T; Kamada, K; Nagata, I; Yamashita, S (2010): MiR-195, miR-455-3p and miR-10a(*) are implicated in acquired temozolomide resistance in glioblastoma multiforme cells. *Cancer Letters* 296 (2), S. 241–248.

Wang, Q; Zhong, M; Liu, W; Li, J; Huang, J; Zheng, L (2011): Alterations of microRNAs in cisplatin-resistant human non-small cell lung cancer cells (A549/DDP). *Experimental Lung Research* 37 (7), S. 427–434.

Wang, S; Tang, C; Zhang, Q; Chen, W (2014): Reduced miR-9 and miR-181a expression down-regulates Bim concentration and promote osteoclasts survival. *Interantional Journal of Clinical Experimental Pathology* 7 (5), S. 2209–2218.

Wang, Z; Yang, J; Xu, G; Wang, W; Liu, C; Yang, H; Yu, Z; Lei, Q; Xiao, L; Xiong, J; Zeng, L; Xiang, J; Ma, J; Li, G; Wu, M (2015): Targeting miR-381-NEFL axis sensitizes glioblastoma cells to temozolomide by regulating stemness factors and multidrug resistance factors. *Oncotarget* 6 (5), S. 3147–3164.

Wei, J; Nduom, EK; Kong, LY; Hashimoto, Y; Xu, S; Gabrusiewicz, K; Ling, X; Huang, N; Qiao, W; Zhou, S; Ivan, C; Fuller, GN; Gilbert, MR; Overwijk, W; Calin, GA; Heimberger, AB (2016): *Neuro-Oncology* 18 (5), S. 639–648.

Wen, PY; Kesari, S (2008): Malignant gliomas in adults. *New England Journal of Medicine* 359 (5), S. 492-507.

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

Wu, H; Liu, Q; Cai, T; Chen, YD; Wang, ZF (2014): MiR-136 modulates glioma cell sensitivity to temozolomide by targeting astrocyte elevated gene-1. *Diagnostic Pathology* 9 (173), S. s13000

Wu, H; Liu, Q; Cai, T; Chen, YD; Wang, ZF (2015): Induction of microRNA-146a is involved in curcumin-mediated enhancement of temozolomide cytotoxicity against human glioblastoma. *Molecular Medicine Reports* 12 (4), S. 5461–5466.

Xiao, S; Yang, Z; Qiu, X; LV, R; Liu, J; Wu, M; Liao, Y; Liu, Q (2016): MiR-29c contribute to glioma cells temozolomide sensitivity by targeting O6-methylguanine-DNA methyltransferases indirectly. *Oncotarget* 7 (31). S. 50229-50238.

Xie, C; Sheng, H; Zhang, N; Li, S; Wei, X, Zheng, X (2016): Association of MSH6 mutation with glioma susceptibility, drug resistance and progression. *Molecular and Clinical Oncology* 5 (2), S. 236–240.

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

Yip, S; Miao, J; Cahill, DP; Iafrate, AJ; Aldape, K; Nutt, CL; Louis, DN (2009): MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. *Clinical Cancer Research* 15 (14), S. 4622–4629.

Zhang, J; Stevens, MF; Bradshaw, TD (2012): Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Current Molecular Pharmacology* 5 (1), S. 102–114.

Zhao, HM; Wei, W; Sun, YH; Gao, JH; Wang, Q; Zheng, JH (2015): MicroRNA-9 promotes tumorigenesis and mediates sensitivity to cisplatin in primary epithelial ovarian cancer cells. *Tumour Biology : the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 36 (9), S. 6867–6873.

Zhou, D; Wan, Y; Xie, D; Wang, Y; Wei, J; Yan, Q; Lu, P; Mo, L; Xie, J; Yang, S; Qi, X (2015): DNMT1 mediates chemosensitivity by reducing methylation of miRNA-20a promoter in glioma cells. *Experimental & Molecular Medicine* 47, S. e182.

Zhou, RJ; Xu, XY; Liu, BX; Dai, WZ; Cai, MQ; Bai, CF; Zhang, XF; Wang, LM; Lin, L; Jia, SZ; Wang, WH (2015): Growth-inhibitory and chemosensitizing effects of microRNA-31 in human glioblastoma multiforme cells. *International Journal of Molecular Medicine* 36 (4), S. 1159–1164.

Zhu, D; Tu, M; Zeng, B; Cai, L; Zheng, W; Su, Z; Yu, Z (2017): Up-regulation of miR-497 confers resistance to temozolomide in human glioma cells by targeting mTOR/Bcl-2. *Cancer Medicine* 6 (2), S. 452–462.

Zhu, Z; Tang, J; Wang, J; Duan, G; Zhou, L; Zhou, X (2016): MiR-138 acts as a tumor suppressor by targeting EZH2 and enhances cisplatin-induced apoptosis in osteosarcoma cells. *PLoS ONE* 11 (3). S. e0150026.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Guido Reifenberger, dass er mir die Möglichkeit gab, im Institut für Neuropathologie zu promovieren. Meiner langjährigen, motivierenden und gewissenhaften Betreuerin Frau Dr. Marietta Wolter danke ich für die großartige Unterstützung und die Geduld in den vielen Jahren, die seit Beginn der Forschungsarbeit vergangen sind. Herrn Prof. Dr. Michael Weller danke ich für die Einladung nach Zürich und die Möglichkeit, 8 Monate in seiner Arbeitsgruppe in der Klinik für Neurologie am UniversitätsSpital Zürich zu forschen. Frau Dr. Caroline Hertler aus der Arbeitsgruppe von Prof. Weller für die tolle Betreuung vor Ort und für die Vorarbeiten, die sie geleistet hat, auf denen diese Arbeit aufbaut. Insbesondere danke ich Frau Dr. Nina Stojceva aus der Arbeitsgruppe von Prof. Weller, die mich hervorragend im Labor in Zürich eingearbeitet und betreut sowie die funktionellen Untersuchungen weiterverfolgt hat.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe am Institut der Neuropathologie Düsseldorf für die motivierende Beratung und Unterstützung. Herr Dr. Steffen Saas aus der Arbeitsgruppe von Herr Prof. Dr. Fabian Theis, Helmholtz-Zentrum München, danke ich für die bioinformatischen Analysen. Ich danke dem Graduiertenkolleg 1033 und der Forschungskommission der Medizinischen Fakultät für die finanzielle Unterstützung meines Forschungsaufenthalts in Zürich sowie der Wilhelm Sander-Stiftung für die finanzielle Unterstützung des Forschungsprojektes, in dem meine Promotionsarbeit eingebettet war.

Ich danke meinen Eltern, meiner Schwester und insbesondere meinem Opa, der mich zwei Jahre lang an jedem Sonntag gefragt hat, wann die Arbeit fertig sein wird.

Ich danke Miriam für den starken Rückhalt in der gesamten Zeit der Promotion und die Ermutigung, die Arbeit abzuschließen. Meinen Freunden danke ich für die kreativen Ratschläge und die Unterstützung, besonders in der finalen Phase. Ana Sherman danke ich, dass sie mich jeden Tag dabei unterstützt, mein volles Potenzial zu entfalten.