

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

Untersuchungen zur möglichen Rolle der langen nicht-
kodierenden RNAs *RAD51-AS1* und *AL109615.3* in
Glioblastomen

Dissertation

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

vorgelegt von
Sarah Magdalene Nöldemann

2021

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Guido Reifenberger

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Sabel

Zusammenfassung

Glioblastome machen etwa die Hälfte aller glialen Hirntumore aus und sind hochmaligne Neoplasien. Die mediane Überlebenszeit von Patienten mit einem Glioblastom beträgt nur etwa 14-16 Monate. Hindernisse einer effektiven Therapie stellen dabei unter anderem das infiltrative Wachstum im Gehirngewebe, ungenügende Ansprechraten auf die Strahlen- und Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ), sowie eine häufige Resistenzentwicklungen der Tumorzellen gegenüber diesen etablierten Therapieverfahren dar. Um die Diagnostik und Therapie von Glioblastomen zu verbessern, ist es wichtig, die molekularen Mechanismen des Tumorwachstums besser zu verstehen. Diesbezüglich gab es in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte und die Bestimmung von molekularen Biomarkern spielt mittlerweile eine große Rolle in der neuropathologischen Diagnostik dieser Tumoren gemäß der von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) herausgegebenen aktuellen Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems.

Die vorliegende Dissertationsarbeit beschäftigt sich mit der möglichen Rolle von langen nicht-kodierenden RNAs in der Pathogenese von Glioblastomen und für das Ansprechen dieser Tumoren auf eine Chemotherapie mit TMZ. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde diesbezüglich eine mögliche differentielle Expression der langen nicht-kodierenden RNA (lncRNA) *RAD51-AS1* in parentalen, das heißt TMZ-sensitiven, versus TMZ-resistenten Glioblastomzelllinien sowie in gepaarten, unbehandelten Primär- versus Rezidivtumorproben nach Radiochemotherapie bestimmt. Zusätzlich wurde eine mögliche Korrelation zwischen der Expression der Kopf-an-Kopf liegenden Gene *RAD51-AS1* und *RAD51* untersucht. *RAD51* kodiert ein DNA-Reparaturprotein, das Teil bestehender Resistenzmechanismen gegenüber der bei Glioblastomen eingesetzten Chemo- und Strahlentherapie ist. Für diese Expressionsanalysen wurden nicht-neoplastische Hirngewebsproben, Tumorgewebeproben aus primären astrozytären Gliomen, Glioblastomzelllinien, sowie Primär- und Rezidivtumorpaaire mittels Endpunkt-PCR und Echtzeit-RT-PCR untersucht. Hierbei ließ sich weder eine differentielle Expression von *RAD51-AS1* in den Gliomen noch eine Korrelation der *RAD51-AS1*- und *RAD51*-Expression auf Transkriptebende nachweisen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein effizienter Knockdown von lncRNAs mittels siRNAs (*small interfering RNAs*) etabliert. Hierzu wurden einzelne siRNAs und

siRNA-Pools getestet. Mittels siRNA-Pools ließ sich ein effizienter Knockdown der langen nicht kodierenden RNA *AL109615.3* in Glioblastomzellen erzielen.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden Prognose-assoziierte, lange nicht-kodierenden RNAs identifiziert und für die lncRNA *AL109615.3* (ENSG00000237686) mittels *in vitro* Funktionsanalysen der Einfluss auf die Vitalität, Proliferation, Apoptose und Nekrose von Glioblastomzellen untersucht. Hierfür wurden nach Knockdown von *AL109615.3* in Glioblastomzelllinien BrdU-, Vitalitäts- und Caspase-3/7-Assays sowie zusätzlich durchflusszytometrische Analysen durchgeführt und die Wachstumsrate bestimmt. Hierbei zeigte sich ein möglicher stimulierender Einfluss von *AL109615.3* auf die Proliferationsrate in Glioblastomzellen. Zusätzlich konnte eine Tendenz zu einer verminderten Vitalität nach Knockdown von *AL109615.3* festgestellt werden.

Der in dieser Arbeit etablierte Knockdown von *AL109615.3* mittels siRNA-Pools kann die Grundlage für weitere Forschungen zur funktionellen Charakterisierung dieser lncRNA in Glioblastomen und ihrer möglichen Bedeutung als prognostisch relevanter molekularer Biomarker bilden.

Summary

Glioblastomas account for about half of all glial brain tumors and are highly malignant neoplasms. The median survival time of patients with glioblastoma is only about 14-16 months. Obstacles to effective therapy include infiltrative growth in the brain tissue, inadequate response rates to radiation and chemotherapy with temozolomide (TMZ), and the frequent development of resistance of tumor cells to the established therapy methods. Thus, to improve the diagnosis and therapy of glioblastomas it is important to better understand the molecular mechanisms of tumor growth. There has been considerable progress in this regard in recent years and the determination of molecular biomarkers now plays a major role in the neuropathological diagnosis of these tumors according to the current classification of tumors of the central nervous system published by the World Health Organization (WHO).

The present thesis deals with the possible role of long non-coding RNAs in the pathogenesis of glioblastomas and for the response of these tumors to chemotherapy with TMZ. In the first part of this work, a possible differential expression of the long non-coding RNA (lncRNA) *RAD51-AS1* in parental, i.e. TMZ-sensitive, versus TMZ-resistant glioblastoma cell lines was investigated. In addition, expression of *RAD51-AS1* was determined in primary (untreated) and paired recurrent glioblastoma tissue samples from patients treated with radiochemotherapy. A possible correlation between the expression of the head-to-head genes *RAD51-AS1* and *RAD51* was also investigated. *RAD51* encodes a DNA repair protein that may contribute to glioblastoma resistance to chemotherapy and radiation therapy. For the expression analyses, non-neoplastic brain tissue samples, tumor tissue samples from primary astrocytic gliomas, glioblastoma cell lines and primary and recurrent tumor pairs were investigated by endpoint PCR and real-time RT-PCR assays. Neither a differential expression of *RAD51-AS1* nor a correlation of *RAD51-AS1* and *RAD51* expression could be detected in the investigated gliomas.

In the second part of this work, an efficient knockdown of lncRNAs using siRNAs (small interfering RNAs) was established. For this purpose, individual siRNAs and siRNA pools were tested. An efficient knockdown of the long non-coding RNA *AL109615.3* in glioblastoma cells was achieved by means of siRNA pools.

In the third part of this work, prognosis-associated long non-coding RNAs were identified and their possible influence on vitality, proliferation, apoptosis and necrosis of glioblastoma cells was investigated using *in vitro* functional assays. For this purpose,

growth curves, BrdU assays, viability assays, caspase 3/7 assays and additional flow cytometric analyses were carried in control and *AL109615.3*-knockdown glioblastoma cell lines. These analyses revealed evidence for a growth-stimulatory effect of *AL109615.3* in glioblastoma cells. In addition, a tendency towards reduced cell viability after knockdown of the *AL109615.3* was seen. The knockdown of *AL109615.3* by means of siRNA pools established in this work can form the basis for further research on the functional characterization of this lncRNA in glioblastomas and its importance as a prognostic molecular biomarker.

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
°C	Grad Celcius
®	Registered trade mark
AACR	American Association for Cancer Research
AAIII	Anaplastisches Astrozytom, WHO-Grad III
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
Ago 2	Argonaute 2
AII	Diffuses Astrozytom, WHO-Grad II
ARF	ADP-ribosylation factor
AS	Antisense
ASO	Antisense oligonucleotides
ATP	Adenosintriphosphat
ATRX	Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
BCNU	1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea
BCR-ABL	Breakpoint cluster region – Abelson, Tyrosinkinase
BER	Base excision repair
Bp	Basenpaare
BRCA	Breast cancer gen
C6ORF223	Chromosome 6 open reading frame 223
Ca.	Circa
CA	California
c-kit	Tyrosinkinase KIT
CDK	Cyclin dependent kinase
CDKN2A	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	Komplementäre DNA
cm²	Quadratzentimeter
CNS-TuBa	ZNS-Tumorgewebebank Düsseldorf
CPEB1	Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
crRNA	CRISPR-RNA
CRNDE	Colorectal neoplasia differentially expressed
CT	Computertomographie
DMC	Alias DYM: Dymeclin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DRAM	Damage-regulated autophagy modulator
DSB	Doppelstrangbrüche
DsiRNA	Dicer-substrate short interfering RNA
DTT	Dithiothreitol

E2F1	E2F transcription factor 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF(R)	Epidermal growth factor (receptor)
EIF4B	Eukaryotic translation initiation factor 4B
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FOXM1	Forkhead-Box-Protein M1
GAS5	Growth arrest-specific 5
GBIV	Glioblastom, WHO-Grad IV
GRIA2	Glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2
h	Stunden
H19	H19 imprinted maternally expressed transcript
H₂O	chemische Summenformel: Wasser
H3F3A	Alias H3-A3: H3.3 Histone A
HMMR	Hyaluronan-mediated motility receptor
HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
HNRPH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1
HO₂	chemische Summenformel: Hydroperoxyl Radikale
HOTAIR	Homeobox transcript antisense RNA
HOX	Homeobox
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HR	Hazard Ratio
HU	Universal human reference RNA
IA	Iowa
IC₅₀	Half maximal inhibitory concentration
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
KIAA0495	Alias: TP73 antisense RNA 1
lncRNA	Long non-coding RNA
MA	Massachusetts
MALAT 1	Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1
MDM 2	Murine double minute 2
MET	Mesenchymal-epithelial transition factor
Mg²⁺	Magnesium
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MIAT	Myocardial infarction associated transcript
min	Minute
miRNA	MikroRNA
miRNP	MicroRNA ribonucleoprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MSH6	MutS Homolog 6
MTIC	3-methyl-(triazin-1-yl)-imidazole-4-carboxamide
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NAT	Natural antisense transcripts

NB	Nicht-neoplastisches Hirngewebe
NC	Negative control
ncRNA	Non-coding RNA
NF1	Neurofibromatosis type 1
nM	Nanomolar
Nr.	Nummer
NY	New York
ODN	Antisense bindende Oligonukleotide
OS	Overall survival
p	Kurzer Arm des Chromosoms
p21	Synonym: CDK-Inhibitor 1
PAR5	Alias PWAR: Prader Willi/Angelman Region RNA 5
PARP1	Poly(ADP-ribose)polymerase
PART1	Prostate androgen-regulated transcript 1
PCA3	Prostate cancer antigen 3
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PIK3CA	Phosphatidylinositol-3-kinase catalytic subunit alpha
PIK3R1	Phosphoinositide-3- kinase regulatory subunit 1
piRNA	Piwi-interacting RNA
POU3F3	POU class 3 homeobox 3
PRNCR1	Prostate cancer associated non-coding RNA 1
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTPRN2	Protein tyrosine phosphatase, receptor type N2
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	Ribonucleic acid interference
RNAse	Ribonuklease
ROS	Reactive oxygen species
Rpm	Revolutions per minute
RT-PCR	Real time-polymerase chain reaction
RYR3	Ryanodin Rezeptor 3
s	Sekunde
siRNA	Small interfering RNA
SD	Standard deviation
snRNA	Small nuclear RNA
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
s.u.	Siehe unten
tacrRNA	Trans-activating crRNA
TANRIC	The atlas of non-coding RNAs in cancer
TCGA	The cancer genome atlas
TERT	Telomerase reverse transcriptase
™	Trade Mark

TMEM106	Transmembrane protein 106
TMZ	Temozolomid
TP53	Tumorsuppressorgen 53
TGF-α	Transforming growth factor- α
TRBP	Trans-activation-responsive RNA-binding protein
tRNA	Transfer RNA
TSIX	Rückwärts: XIST (X-inactive specific transcript)
TUG1	Taurine up-regulated 1
U	Unit
UBXN10	UBX domain protein 10
UCA1	Urothelial cancer associated 1
UNG	Uracil-N glycosylase
WHO	World Health Organisation
WI	Wisconsin
XIST	X-inactive specific transcript
XRCC	X-ray repair cross-complementing
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Glioblastome	1
1.1.1 Überblick und Epidemiologie	1
1.1.2 Klinik	2
1.1.3 Klassifikation	3
1.1.4 Therapie von Glioblastomen	7
1.2 Lange nicht-kodierende RNAs	10
1.2.1 Funktionen von lncRNAs	11
1.2.2 Bedeutung von lncRNAs in Tumoren	13
1.2.3 Bedeutung von lncRNAs in Glioblastomen	17
1.2.4 Bedeutung der lncRNA <i>RAD51-AS1</i> in Glioblastomen	20
1.3 Ziele dieser Arbeit	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Zelllinien	22
2.1.2 Kommerziell erhältliche RNA-Proben	22
2.1.3 Proben aus der ZNS-Tumorgewebbank Düsseldorf (CNS-TuBa)	23
2.1.4 siRNAs	24
2.1.5 Primersequenzen	25
2.1.6 Chemikalien, Reagenzien, Kits	28
2.1.7 Geräte und Software	30
2.2 Methoden	31
2.2.1 RNA-Extraktion	31
2.2.2 cDNA-Synthese	31
2.2.3 Endpunkt-PCR	31
2.2.4 Echtzeit-RT-PCR	33
2.2.5 Kultivierung der Glioblastomzelllinien	34
2.2.6 Mykoplasmentestung der Glioblastomzelllinien	35
2.2.7 Transfektion von Glioblastomzellen mit einzelnen siRNAs	37
2.2.8 Transfektion von Glioblastomzellen mit siRNA-Pools	40
2.2.9 Bromdesoxyuridin (BrdU) Proliferations-Assay	41
2.2.10 Zellvitalitäts-Assay	41
2.2.11 Caspase-3/7-Assay	41
2.2.12 Durchflusszytometrie	41

2.2.13	Zellzahlbestimmung	42
2.2.14	Statistische Auswertungen	43
3.	Ergebnisse	44
3.1	Expressionsanalysen von <i>RAD51-AS1</i> und <i>RAD51</i> in Glioblastomzelllinien und Tumorgewebeproben aus primären und rezidierten Glioblastomen	44
3.1.1	Vorarbeiten zur Auswahl der lncRNA <i>RAD51-AS1</i>	44
3.1.2	Expressionsanalysen von <i>RAD51-AS1</i> und <i>RAD51</i> in parentalen und TMZ-resistenten Zelllinien	46
3.1.3	Expressionsanalysen von <i>p21</i> , <i>MSH6</i> und <i>MGMT</i> in parentalen und TMZ-resistenten Zelllinien	48
3.1.4	Expressionsanalysen von <i>RAD51-AS1</i> und <i>RAD51</i> in Primär- und Rezidivtumorproben von Glioblastompatienten	50
3.2	Optimierung des Knockdowns von <i>RAD51-AS1</i> in Gliomzellen	53
3.2.1	Herunterregulation von <i>RAD51-AS1</i> mittels einzelner siRNAs	53
3.2.2	Herunterregulation von <i>RAD51-AS1</i> mittels siRNA-Pools	58
3.3	Expressionsanalysen von Prognose-assoziierten lncRNAs	61
3.3.1	Vorarbeiten zur Auswahl der Prognose-assoziierten lncRNAs	61
3.3.2	Optimierung der PCR-Bedingungen	65
3.3.3	Expressionsanalysen der lncRNAs <i>TMEM106A-AS1</i> , <i>AC055874.1</i> und <i>AL109615.3</i> in Gliomen und Glioblastomzelllinien	66
3.3.4	Subzelluläre Lokalisation der lncRNA <i>AL109615.3</i>	70
3.3.5	Auswahl der lncRNA <i>AL109615.3</i> für funktionelle Untersuchungen in kultivierten Glioblastomzellen	70
3.4	Funktionelle Analyse von <i>AL109615.3</i> in Glioblastomzellen	71
3.4.1	Optimierung und Validierung des Knockdowns von <i>AL109615.3</i> nach Transfektion von U87MG Zellen mit siRNA-Pools	72
3.4.2	Bestimmung der Apoptoserate von U87MG Zellen nach Knockdown von <i>AL109615.3</i>	73
3.4.3	Bestimmung der Proliferationsrate von U87MG Zellen nach Knockdown von <i>AL109615.3</i>	74
3.4.4	Bestimmung der Vitalität von U87MG Zellen nach Knockdown von <i>AL109615.3</i>	75
3.4.5	Wachstumsanalysen der U87MG Zellen nach Knockdown von <i>AL109615.3</i>	76
3.4.6	Durchflusszytometrische Analyse der U87MG Zellen nach Knockdown von <i>AL109615.3</i>	77

4. Diskussion	79
4.1 Zusammenhang zwischen der Expression von <i>RAD51-AS1</i> und <i>RAD51</i> in Glioblastomzelllinien und Glioblastomen	79
4.1.1 Bedeutung des DNA-Reparaturgens <i>RAD51</i> in Glioblastomen	79
4.1.2 Bedeutung der lncRNA <i>RAD51-AS1</i> und ihrer genomischen Lage zu <i>RAD51</i>	81
4.1.3 Expressionsanalysen der lncRNA <i>RAD51-AS1</i> und <i>RAD51</i> in Gliomzellen und Glioblastomen	83
4.2 Funktion und Bedeutung von siRNAs	86
4.2.1 Differenzierung zwischen einzelnen siRNAs und siRNA-Pools	87
4.2.2 Einsatz von siRNA gesteuertem Knockdown <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	92
4.3 Prognose-assoziierte lncRNAs	95
4.3.1 Auswahlprozess der Prognose-assoziierten lncRNAs	95
4.3.2 Spleißvarianten bei lncRNAs	97
4.3.3 Expressionsanalysen der lncRNAs <i>TMEM106A-AS1</i> , <i>AC055874.1</i> und <i>AL109615.3</i>	98
4.3.4 Bedeutung der lncRNA <i>AL109615.3</i> in Glioblastomen	99
4.4 Schlussfolgerung	103
5. Literatur – und Quellenverzeichnis	106
6. Danksagung	126

1. Einleitung

1.1 Glioblastome

1.1.1 Überblick und Epidemiologie

Gehirntumoren gehören zu den selteneren Krebserkrankungen des Menschen. Mit einer Inzidenz von ca. 7000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland machen sie etwa zwei Prozent aller Krebserkrankungen aus. [1-3] Man kann Gehirntumoren in zwei Gruppen einteilen, die primären und die sekundären Gehirntumoren. Primäre Tumoren entstehen vor Ort, z.B. im Fall der Gliome aus neuroglialen Stammzellen oder Vorläuferzellen, wohingegen sekundäre Tumoren metastatische Absiedlungen anderer Krebserkrankungen sind und somit nicht zu den hirneigenen Tumoren zählen. [4, 5]

Ätiologisch gesehen gibt es kaum Anhaltspunkte, warum sich primäre Gehirntumoren entwickeln. Über 90 % entstehen sporadisch, man kann sich ihre genaue Ursache also nicht herleiten. [6] Weniger als 5 % der Gehirntumoren lassen sich auf genetische Ursachen zurückführen. Hierbei spielen auch familiäre Einflüsse eine Rolle. So gibt es Anhaltspunkte für eine Assoziation mit vererbbaaren Erkrankungen, wie der tuberösen Sklerose, den Neurofibromatosen Typ 1 und Typ 2, dem Li-Fraumeni-Syndrom, dem Turcot-Syndrom oder auch dem erblichen Retinoblastomen. [7-9]

Sehr selten entstehen die primären Gehirntumoren als Spätfolge einer stattgehabten Therapie, insbesondere eine Strahlentherapie, und sind somit iatrogenen Ursprungs. [10-12] Ionisierende Strahlung ist die einzige gut belegte Ursache für die Entstehung von Gehirntumoren im Menschen. [9, 10, 13] Des weiteren werden exogene Einflüsse wie das Rauchen, [14, 15] diätische Aspekte, [16] Mobiltelefonbenutzung, [17-19] oder auch weiteren Aspekte wie Medikamente, [20] Allergien, [21, 22] der Immunstatus, [23] oder virale Infektionen, beispielsweise durch das humane Zytomegalievirus, [24] diskutiert.

Glioblastome sind hochmaligne Gehirntumoren, die durch die WHO (World Health Organisation) in den WHO-Grad IV eingestuft werden. [25] Dies bedeutet, dass Glioblastome eine sehr hohe Zelldichte, viele Atypien und eine sehr hohe Mitoserate aufweisen. Das rasche Wachstum des Tumors geht einher mit pathologischen Gefäßproliferationen und Nekrosen. Dies führt im makroskopischen Präparat zu einem

bunten Bild von Nekrosen, Einblutungen und vitalen Tumoranteilen. [26] Die makroskopische Erscheinung ist der Grund, warum das Glioblastom früher auch als „Glioblastoma multiforme“ bezeichnet wurde. [5]

Der Altersgipfel für Patienten mit einem Glioblastom liegt zwischen 50-70 Jahren und es gibt etwa 3000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland. [2] Glioblastome machen dabei etwa 50 % aller neudiagnostizierten Gliome aus, zu denen die Astrozytome, Oligodendrogliome und auch Ependymome zählen. [27] Das mediane Überleben von Glioblastompatienten beträgt nur etwa 14-16 Monate nach Diagnosestellung. [28] Hierbei erfolgt die erste Diagnosestellung des Glioblastoms meist anhand einer Aufnahme mittels Magnetresonanztomographie (MRT) oder Computertomographie (CT). Bei der Verwendung von Kontrastmittel zeigt sich häufig eine typische girlandenförmige Kontrastmittelanreicherung mit zentraler Nekrose des Tumorgewebes. [29] In über 95 % der Patienten ist das Glioblastom supratentoriell in den Hemisphären des Großhirns lokalisiert. [29, 30]

1.1.2 Klinik

Zu den klinischen Anzeichen eines Gehirntumors gehört häufig ein epileptischer Anfall. Weiterhin treten bei etwa der Hälfte der Patienten vermehrt morgendliche Kopfschmerzen auf. Außerdem kann es häufig zu neurologischen Ausfällen kommen, hierbei handelt es sich beispielsweise um Paresen, aber auch Sensibilitäts- und Sprachstörungen. Des weiteren können psychische Veränderungen auftreten. Hierzu zählen beispielsweise Persönlichkeitsveränderungen, Affektstörungen oder Enthemmungen. [31-33]

Gehirntumoren haben aufgrund ihrer Tumorlokalisation besondere Symptomkomplexe zur Folge. Bei progredienten Tumorwachstum besteht durch die knöcherne Begrenzung nur wenig Ausweichmöglichkeit für das Gehirn. Somit können auch gutartige, langsam wachsende Tumore schlimme Auswirkungen haben, wenn sie lebenswichtige Regionen im Gehirn verdrängen. Weitere Ursachen für Komplikationen können Tumorblutungen oder beispielsweise auch ein perifokales Hirnödem sein. Beide Faktoren können den intrakraniellen Druck stark erhöhen. [34, 35] Zusätzlich kann es dazu kommen, dass der Gehirntumor die Liquorwege blockiert. Dies hat zur Folge, dass der Liquor nicht mehr wie gewohnt zirkulieren kann. Befindet sich die Engstelle im Abflussgebiet, staut sich der Liquor in den Liquorräumen zurück. Es kommt zum Hydrozephalus occlusus und das

umliegende Gehirngewebe wird zusätzlich zusammengedrängt. Klinisch gesehen ergeben sich in den beschriebenen Fällen meist sogenannte allgemeine Hirndruckzeichen, welche innerhalb von wenigen Stunden auftreten können. Hierzu zählen beispielsweise Übelkeit oder Erbrechen, Kopfschmerzen und Schwindel. Diagnostisch wegweisen sind außerdem eine Benommenheit des Patienten und zusätzliche Symptome wie Atemstörungen, eine Bradykardie, sowie auch Hypertonien oder Stauungspapillen. [35-38] Der intrakranielle Druckanstieg kann soweit führen, dass der Patient komatös wird. Zudem kann es zu einer oberen oder unteren Einklemmung von Teilen des Gehirns kommen. Bei der oberen Einklemmung kommt es zur Verschiebung von Gehirnwindungen des Temporallappens durch den Tentoriumschlitz in die hintere Schädelgrube. Bei der unteren Einklemmung werden Teile des Kleinhirns durch das Foramen Magnum verschoben und es kommt zum Druck auf das verlängerte Rückenmark. Ein massiver Druckanstieg kann Auswirkungen auf zentralen Regulationszentren, wie das Atemzentrum in der Medulla oblongata, haben. In Folge dessen kann der Patient versterben. [39]

Metastasen eines Glioblastoms sind sehr selten. Falls Metastasen auftreten, entstehen die Neubildungen größtenteils ebenfalls im Gehirn oder im Rückenmark über eine liquorigene Aussaat von Tumorzellen. Extrakranielle Metastasen können als Folge einer Verschleppung von Tumorzellen über das Blutgefäßsystem erfolgen. [40] Vereinzelt wurde über solche, sehr seltenen extrakraniellen Metastasen, beispielsweise in der Leber, der Milz, dem Pankreas, der Lunge oder im Knochensystem berichtet. [41-44] In diesem Fall können die Metastasen ebenfalls klinische Symptome wie Oberbauchschmerzen, Husten, Knochenschmerzen und auch pathologische Frakturen hervorrufen. [41-44]

1.1.3 Klassifikation

Gehirntumoren werden aufgrund histologischer Kriterien gemäß der WHO-Klassifikation von Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) in die WHO-Grade I-IV eingeteilt. Hirntumoren des WHO-Grades I, wie beispielsweise das pilozytische Astrozytom, sind im Regelfall mit einer guten Prognose assoziiert. Glioblastome wiederum werden in den WHO-Grad IV eingestuft und gehen mit einer sehr schlechten Prognose einher. [27]

Seit 2016 gibt es eine neue WHO-Klassifikation zur Einteilung der ZNS-Tumoren. Diese Einteilung basiert unter anderem für die häufigsten Gliome auf einem mehrschichtigen

Modell. [25, 45] Hierbei wird das operativ entfernte Tumorgewebe zunächst histologisch unter dem Lichtmikroskop untersucht. Bei der mikroskopischen Beurteilung wird auf in der WHO-Klassifikation definierte Merkmale geachtet. Hierzu zählen unter anderem die Tumorzelldichte, Zelldysplasien, die Mitoserate, sowie das Vorkommen von pathologischen Gefäßproliferaten oder Nekrosen. [46] Anschließend werden die Tumorzellen auf molekularbiologische Veränderungen getestet. Diese molekularbiologischen Untersuchungen ermöglichen eine Verknüpfung zwischen Phänotyp und Genotyp. [25] Diese integrierte, d.h. histomolekulare Klassifikation erlaubt eine genauere Diagnosestellung und bildet die Grundlage individueller und zielgerichteter Therapieansätze. [27, 47]

Anhand des molekularbiologischen Befundes kann man zunächst unterscheiden, ob es sich um ein Isocitratdehydrogenase (IDH)-Wildtyp oder ein IDH-mutiertes Glioblastom handelt. Rund 90 % der Glioblastome werden als IDH-Wildtyp Glioblastom klassifiziert und entstehen häufig *de novo*, d.h. ohne niedriggradigere Vorläuferläsion. Bei ca. 5–10 % der Patienten entsteht das Glioblastom allerdings durch Progression eines vorbestehenden niedriggradigeren Tumors, beispielsweise eines diffusen (WHO-Grad II) oder anaplastischen (WHO-Grad III) Astrozytoms [48]. Diese Tumoren lassen sich vor allem bei jüngeren Glioblastompatienten beobachten. [49] Diese Form des Glioblastoms ist molekularbiologisch oft durch eine IDH-Mutation gekennzeichnet. [50] In Folge dessen werden die Tumoren als IDH-mutierte Glioblastome bezeichnet [25].

Die Isocitratdehydrogenase katalysiert die Umwandlung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat im Rahmen des Zitratzyklus. Als Kofaktor entsteht bei dieser Reaktion zusätzlich NADPH aus NADP⁺. [51] NADPH spielt in vielen biosynthetischen Vorgängen eine wichtige Rolle, unter anderem bei der zellulären Abwehr gegen oxidativen Stress. Solch oxidativer Stress entsteht beispielsweise im Rahmen der Strahlen- und Chemotherapie. IDH-mutierte Tumorzellen haben durch die Mutation höhere Spiegel freier Radikale und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). [52] Aufgrund dessen zeigen IDH-mutierte Gliome im Vergleich zu IDH-Wildtyp Glioblastomen häufig ein besseres Ansprechen auf Strahlen- und Chemotherapie und sind mit einem längeren medianen Überleben der Patienten assoziiert. Im Schnitt überleben Patienten mit IDH-mutierten Glioblastomen mehr als 30 Monate nach Diagnosestellung, Patienten mit IDH-Wildtyp Glioblastomen dagegen nur rund 14-16 Monate. [27, 47, 51]

In IDH-mutierten Glioblastomen ist eine *IDH*- oder *IDH2*-Mutation oft an eine *TP53*- oder *ATRX*-Mutation, Verluste von 19q oder 10q, und eine homozygoten Deletion des

CDKN2A-Gens gekoppelt. [53, 54] Das Gen *TP53* kodiert dabei für das Protein p53, welches als Tumorsuppressor agiert. In dieser Funktion kann p53 nach einer Schädigung der DNA die Signalwege in der Zelle beeinflussen. Zellen können so durch selbstständige Reparaturfunktionen, [55] autophagischer Prozesse [56, 57] oder in Form von Apoptose [58] auf die Schädigung reagieren. In vielen Tumorzellen kommt es durch eine *TP53*-Punktmutation zu einem Funktionsverlust von p53 und somit zu verminderten DNA-Reparaturmechanismen in den Zellen. [49, 59]

Bei IDH-mutierten Glioblastomen gehen *TP53*-Mutationen oft mit einer inaktivierenden Mutation im *ATRX*-Gen einher. Der Verlust des Transkriptionsregulators *ATRX* (*α-thalassemia/mental-retardation-syndrome-X-linked*) führt zu einer Stabilisierung der Telomere (Chromosomenenden). [60] Ohne ein funktionsfähiges *ATRX*-Gen ist ein Teil des natürlichen Schutzes der Zellen vor Überalterung vermindert, d.h. die Tumorzellen können sich unbegrenzt teilen und untergehen nicht einer replikativen Seneszenz. [61, 62] Mehr als zwei Drittel der IDH-mutierten Glioblastome weisen außerdem eine Deletion auf Chromosom 10 auf. Hierbei kann entweder der lange Arm, also 10q fehlen, oder das gesamte Chromosom 10. Verschiedene Tumorsuppressorgene liegen auf dem Chromosom 10. Ein Zusammenhang zwischen dem Verlust dieser Gene und der Pathogenese des Glioblastoms ist somit anzunehmen. [54, 63, 64] Eine Deletion des *CDKN2A* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*)-Genlokus auf 9p21 führt zur Inaktivierung der beiden von *CDKN2A*-kodierten Proteine, p16 und p14^{arf}, welche als Tumorsuppressorproteine den Zellzyklus mit beeinflussen können. [65]

Weitaus häufiger, nämlich bei über 90 % der Glioblastompatienten, handelt es sich um IDH-Wildtyp Glioblastome. [49, 54] Molekularbiologische Veränderungen in IDH-Wildtyp Glioblastomen sind beispielsweise eine *TERT*-Promotormutation oder *PTEN*-, *TP53*-, *PIK3CA*-, *PIK3R1*- oder *NF1*-Mutationen. Zudem kann es zu homozygoten Deletionen von *CDKN2A* oder *PTEN* kommen. [53] Einer der klinisch bedeutendsten molekularen Marker bei Glioblastomen ist zudem der *MGMT*-Promoter Methylierungsstatus (siehe 1.1.4). Einen kurzen Überblick über die Vielschichtigkeit der molekularen Veränderungen in IDH-Wildtyp Glioblastomen kann eine Fokussierung auf die *TERT*-Promotermutationen, *EGFR*-Überexpression, *EGF*- und *PDGFA*-Rezeptor Amplifikation und Inaktivierung des *PTEN*-Gens geben.

Eine aktivierende *TERT*-Promotormutation führt zu einer erhöhten Expression von *TERT*. *TERT* steht dabei für die *Telomerase reverse Transcriptase*. Diese Transkriptase ist dafür zuständig, verkürzte Telomere nach der Replikation wieder zu verlängern und trägt somit

zum Überleben der Zelle bei. [66-68] Mehr als zwei Drittel der IDH-Wildtyp Glioblastome weisen eine *TERT*-Promotormutation auf. [66, 69] Eine prognostische Bedeutung dieser Mutation wird in der Literatur unterschiedlich diskutiert. Einige Arbeiten fanden eine Assoziation mit kürzerem medianen Überleben [66, 70, 71] und propagierten *TERT*-Promotormutationen als einen prognostisch ungünstigen Marker. [71, 72]

Pathogenetisch und diagnostisch relevant ist weiterhin eine *EGF*-Rezeptor Amplifikation, die in ungefähr 30-40 % der IDH-Wildtyp Glioblastome nachweisbar ist. [54] Zudem kann es zu einer *EGFR*-Überexpression kommen. Dies ist bei rund zwei Drittel der IDH-Wildtyp Glioblastome der Fall. [49] Der EGF-Rezeptor interagiert mit den Wachstumsfaktoren EGF (*Epidermal Growth Factor*) und TGF- α (*Transforming Growth Factor- α*), welche bei der Einleitung der Mitose und somit bei der Zellteilung und Zellproliferation eine große Rolle spielen. Eine Überexpression von EGF-Rezeptoren mit vermehrter Bindung der Wachstumsfaktoren kann somit das Tumorwachstum von Glioblastomen fördern. [73-75] Eine *PDGF* (*Platelet-Derived Growth Factor*)-Rezeptor-A Amplifikation führt ebenfalls zu einer erhöhten Zellproliferation und -migration und weiterhin zu einer verstärkten Angiogenese. Die *PDGFRA*-Amplifikation wird demnach ebenfalls als molekularer Treiber des Wachstums von Glioblastomen betrachtet. [76-78]

Eine weitere Veränderung betrifft das *PTEN* (*Phosphate and Tensin Homolog*)-Gen auf dem langen Arm von Chromosom 10. *PTEN* steht für einen Tumorsuppressorgen, welches eine wichtige Rolle bei der Regulation von Adhäsion, Invasion und Apoptose spielt und zudem in die Regulation der DNA-Reparatur involviert sein kann. Eine Deletion oder Mutation des *PTEN*-Gens, welche in 20-30 % der IDH-Wildtyp Glioblastome nachweisbar ist [54], stellt somit ebenfalls einen pathogenetisch relevanten Faktor für das Glioblastomwachstum dar. [79-83]

In der Onkologie setzt man sich heutzutage verschiedene Ziele. Höchste Priorität hat die bestmögliche Betreuung und therapeutische Versorgung der Patienten. Dabei ist es von zunehmender Bedeutung, nicht jeden Tumor gleich zu behandeln, da nicht jede Tumorzelle aufgrund ihrer molekularen Grundlagen gleichermaßen auf eine standardisierte Therapie anspricht. Für die optimale Versorgung des Patienten ist es somit wichtig, den individuellen Tumorprozess zu verstehen, um die Therapiemöglichkeiten anpassen zu können. Des weiteren ist es wichtig, die Patienten über eine mögliche

Prognose ihres Krankheitsverlaufs und die notwendige Behandlung möglichst präzise aufklären zu können. Die molekulare Diagnostik kann auch hierbei helfen, um den Patienten einen genaueren Ausblick über Therapiemöglichkeiten und -ansprechraten geben zu können. Die integrierte Klassifikation von Gliomen gemäß der WHO-Klassifikationsleitlinien aus dem Jahre 2016 führt somit zu besser an den einzelnen Patienten angepassten Prognose- und Therapiemöglichkeiten. [47, 53, 84]

1.1.4 Therapie von Glioblastomen

Glioblastome sind die häufigsten und zugleich bösartigsten Hirntumoren im Erwachsenenalter. Trotz einer multimodalen Therapie bestehend aus chirurgischer Entfernung, Strahlentherapie und Chemotherapie liegt die zwei Jahres Überlebensrate bei Glioblastompatienten nur bei etwa 15 %. [27] Durch das diffus-infiltrative Wachstum des Glioblastoms ist es in der Regel nicht möglich, den Tumor komplett zu resektieren, ohne dass für den Patienten Folgeschäden entstehen. Hierzu zählen vor allen Dingen neurologische Ausfälle. Um diese verhindern zu können, werden während der Operation verschiedene Techniken angewendet. Hierzu gehören intraoperatives Mapping, Neuromapping, Fluoreszenzmarkierungen, Ultraschall oder der Einsatz eines intraoperativen MRTs. [85] Nach der Operation wird als Goldstandard eine Strahlentherapie kombiniert mit einer Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) eingeleitet. Anschließend werden sechs Zyklen einer alleinigen TMZ-Therapie empfohlen. [86, 87] Allerdings gibt es in diesem Behandlungskonzept einige therapeutische Hindernisse, welche nachfolgend beleuchtet werden. So zeigt beispielsweise die Strahlentherapie unterschiedliche Ansprechraten bei Glioblastomen. Dies liegt zum Teil darin begründet, dass es Bereiche in den Tumoren gibt, die eine verminderte Sauerstoffkapazität aufweisen. Bei der Strahlentherapie werden unter anderem HO_2 (Hydroperoxyl-Radikale) und ROS-Spezies (*Reactive Oxygen Species*) gebildet, welche zu DNA-Veränderungen und nachfolgend zu strahleninduziertem Zelltod führen können. [88] Bei starker Ausprägung von hypoxischen Bereichen in Glioblastomen können durch eine Strahlentherapie weniger Effekte erzielt werden. [89] Durch die Strahlentherapie verursachte DNA-Läsionen können zusätzlich durch DNA-Reparaturmechanismen wieder behoben werden. Tumorzellen mit einer hohen, effizienten DNA-Reparatur können dadurch resistent werden. [90, 91]

Neben der Strahlentherapie werden auch Chemotherapeutika bei der Therapie des Glioblastoms eingesetzt. Bei der Etablierung von geeigneten Chemotherapeutika ist es zunächst entscheidend, dass nicht alle Medikamente die Blut-Hirnschranke überwinden können. [92] Eine Möglichkeit dieses therapeutische Hindernis zu umgehen, ist der Einsatz von lokalen Chemotherapeutika. Nach einer Operation ist es z.B. möglich, im Operationsgebiet mit Medikamenten angereicherte Platten einzulegen, die anschließend lokal ihre Wirkung entfalten können. Der Wirkstoff, der hierbei genutzt wird, ist das Chemotherapeutikum BCNU (1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea) und die Platten sind bekannt als Gliadel ® wafers. Diese erweiterte Therapiemöglichkeit konnte in diversen Studien einen Überlebensvorteil im Vergleich zum Placebo zeigen. [93-95] Auch im Zusammenhang mit einer nachfolgenden Strahlentherapie zeigten sich keine Nachteile durch die lokal eingesetzten Platten. [96] Mit Einführung des oralen Chemotherapeutikums Temozolomid (TMZ) als Standardtherapie des Glioblastoms kommt die lokale BCNU-Gabe allerdings nicht mehr in der Primärtherapie zum Einsatz. Bei TMZ handelt es sich um ein alkylierendes Zytostatikum, welches die Blut-Hirnschranke überwinden kann. TMZ wird gut toleriert, kann als Tablette verabreicht werden und weist weniger Nebenwirkungen auf als vergleichbare Medikamente. [97] Die häufigsten Nebenwirkungen von TMZ sind Übelkeit und Erbrechen. Dies lässt sich jedoch durch eine begleitende Antiemetikatherapie oft gut eindämmen. [98] Eine weitere häufig auftretende Nebenwirkung ist die Myelosuppression, die eine konsequente Betreuung des Patienten und wiederholende Kontrollen der Blutkörperchen nötig macht. [99-101]

Für die Wirkungsweise von TMZ ist entscheidend, dass es als Prodrug verabreicht und anschließend im Körper umgewandelt wird. Ein Endprodukt der Hydrolyse im Körper ist das MTIC (3-methyl-(triazin-1-yl)-imidazole-4-carboxamide). MTIC ist in der Lage, die O³ Position der Base Adenin und die N⁷ und O⁶ Position des Guanins zu methylieren. [102, 103] Letzteres führt anschließend unter anderem zu Fehlpaarungen der Basen Guanin und Thymin, anstatt von Guanin und Cytosin. Dieser fehlerhafte Zusammenschluss von Basen führt zum DNA-Replikationsabbruch. Hierdurch kommt es zum Zellzyklusarrest und schließlich zur Apoptose der sich schnellteilenden Tumorzellen. [86]

Der wichtigste molekulare Prädiktor des Ansprechens von Gliomzellen auf das alkylierende Chemotherapeutikum TMZ ist der *MGMT*-Promotor-Methylierungsstatus. Bei ungefähr 30-40 % der IDH-Wildtyp Glioblastompatienten lässt sich eine

Methylierung im *MGMT*-Promoter nachweisen. [104] *MGMT* steht dabei für die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase. Diese Methyltransferase entfernt unter anderem Methylgruppen von der Position O⁶ des Guanins und schützt die DNA so vor mutagenen Alkylierungen, da diese unter anderem schädliche Effekte haben und zur Tumorentstehung beitragen können. [105-109] Im Rahmen der TMZ-Therapie kann die Methyltransferase die von TMZ hervorgerufenen Methylierungen an der Position O⁶ des Guanins wieder entfernen. Hierdurch kommt es zu einem unerwünschten Effekt, nämlich zu einer verminderten Anzahl von Kettenabbrüchen und somit zu einer geringeren Apoptoserate der Glioblastomzellen. Eine Methylierung in der *MGMT*-Promotorregion sorgt für eine verminderte Expressionsrate der Methyltransferase. [110] Somit kann der Effekt von TMZ auf die Glioblastomzellen nicht mehr so häufig rückgängig gemacht werden und die Zellen reagieren sensibler auf das Chemotherapeutikum. Die Methylierung in der *MGMT*-Promotorregion ist somit ein Vorteil bei der Therapie mit TMZ. Patienten mit *MGMT*-Promotor-methylierten Glioblastomen zeigen ein verlängertes medianes Überleben nach TMZ-Therapie im Vergleich zu Patienten mit *MGMT*-Promotor-unmethylierten Glioblastomen. [105-109]

Neben dem *MGMT*-Methylierungsstatus spielen auch andere Mechanismen eine Rolle für die Resistenz von Gliomzellen gegenüber TMZ. Hierzu zählen unter anderem Veränderungen im *Mismatch Repair (MMR) Pathway* [111, 112], eine erhöhte DNA-Reparaturrate über die Polymerase PARP1 (Poly(ADP-ribose)polymerase), [113, 114] oder auch zelluläre Dysregulation durch Veränderungen von Signalwegen wichtiger Regulationsfaktoren, wie p53 und EGFR. [115] Es gibt zudem vermutlich noch weitere, bislang unentdeckte molekulare Veränderungen, die zur TMZ-Resistenz von Glioblastomen beitragen können. Die Ergebnisse verschiedener Studien über nicht-kodierende RNAs geben erste Hinweise darauf, dass auch lange nicht-kodierende RNAs Einfluss auf das Ansprechen von TMZ haben könnten. [116-119] Dieser mögliche Einfluss ist somit ein Schwerpunkt dieser Arbeit und soll im Rahmen der Dissertation weiter untersucht werden.

1.2 Lange nicht-kodierende RNAs

Im menschlichen Körper kodiert nur etwa 2 % der transkribierten RNA für Proteine. Die restlichen 98 % der transkribierten RNA kodiert nicht für Proteine, daher der Name nicht-kodierende RNA oder auch ncRNA (non-coding RNA). [120-122] Lange Zeit wurde dieser Teil des Transkriptoms als „junk-RNA“ bezeichnet, frei übersetzt als „Müll-RNA“, und somit für nicht wichtig befunden. Mittlerweile wurde allerdings eine Vielzahl von Funktionen von ncRNAs entdeckt. [123-125] Ziel dieser zahlreichen Forschungen ist es, die Zellfunktionen auf molekularer Ebene besser zu verstehen und somit auch das Wissen über Pathologien und Krankheitsentstehungen stetig zu erweitern.

Nicht-kodierende RNAs lassen sich aufgrund ihrer Länge in zwei verschiedene Untergruppen aufteilen, die kurzen und die langen nicht-kodierenden RNAs. Zu den kurzen nicht-kodierenden RNAs zählen beispielsweise die tRNAs (*transfer*), miRNAs (*micro*), siRNAs (*small interfering*) oder snRNAs (*small nuclear*). [126] Die langen ncRNAs (*long non-coding* RNAs, lncRNAs), um welche es in dieser Arbeit geht, definieren sich über eine Größe von mehr als 200 Nukleotiden. [123] Im Vergleich zu manchen kurzen RNAs, wie beispielsweise den miRNAs, ist über die Gruppe der lncRNAs teilweise noch weniger bekannt. [127-129] Das liegt auch daran, dass viele lncRNAs nur sehr gering exprimiert werden und lange nur als „transkriptionelles Rauschen“ wahrgenommen wurden. [130] Rund 80 % der lncRNAs sind nur wenig konserviert und primatenspezifisch. Rund 3 % der lncRNAs sind jedoch im Gegensatz dazu ultrakonserviert und teilweise seit etwa 300 Millionen Jahren in Organismen zu finden. Ein evolutionsbiologischer Nutzen von lncRNAs ist somit nicht auszuschließen. [131-133] Etwa zwei Drittel der lncRNAs werden durch die RNA-Polymerase II transkribiert. Die meisten haben zudem eine 5'-Kappe, einen 3'-Poly-A-Schwanz, mehrere Exone und unterliegen unter anderem auch alternativem Spleißen. [134, 135] Sie sind somit mit epigenetischen Signaturen assoziiert, die normalerweise nur mit proteinkodierenden Genen in Verbindung gebracht werden. [135, 136]

In den letzten Jahren wurde immer mehr über die Rolle der lncRNAs in physiologischen und pathologischen Zellabläufen bekannt. So wurde eine Vielzahl von Funktionen und Mechanismen entdeckt, wie lncRNAs interagieren und in die zellulären Abläufe eingreifen können. [128] Die vielfältigen Wirkungsweisen machen lncRNAs zu einem spannenden Teil aktueller Forschungen und zum wichtigen Bestandteil dieser Arbeit.

1.2.1 Funktionen von lncRNAs

lncRNAs haben verschiedene Funktionen und können sich im Nukleus und Zytoplasma befinden, wo sie unterschiedlichen Aufgaben übernehmen können. Einige ihrer Funktionen sind in Abb. 1 dargestellt.

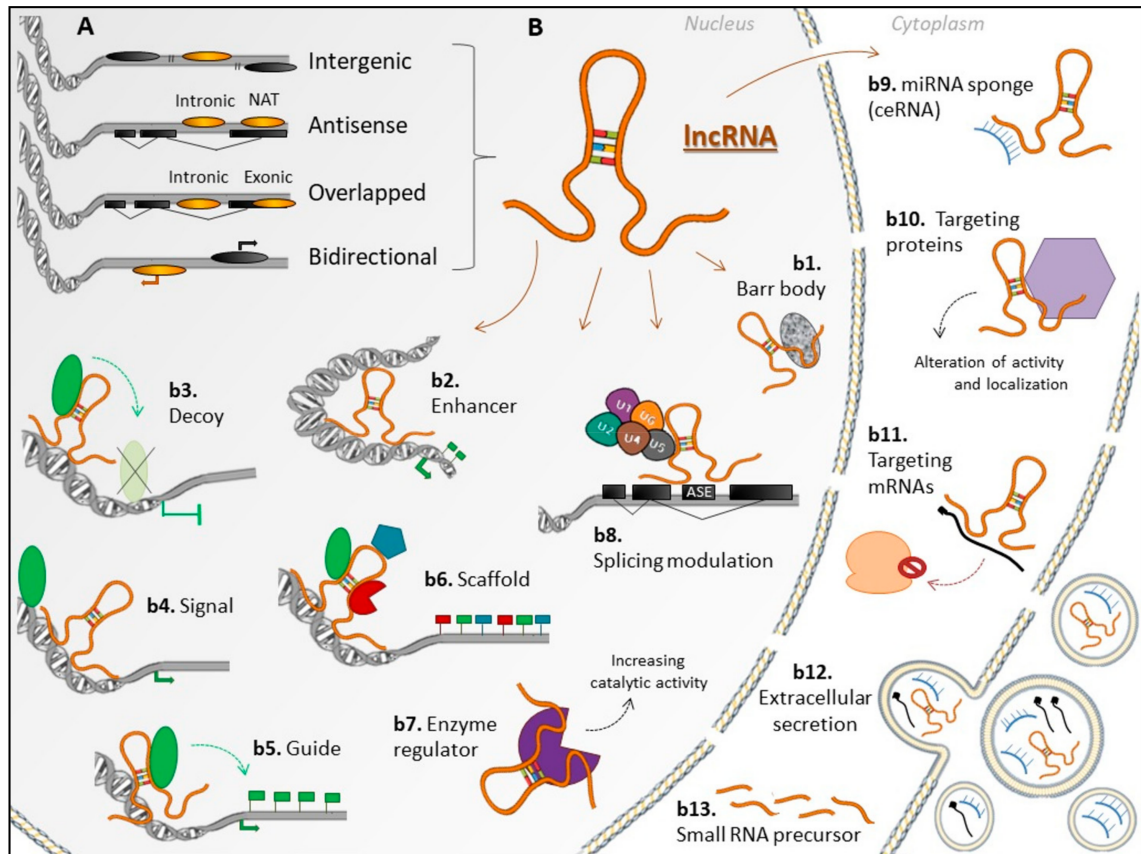


Abbildung 1: Lokalisationen und Funktionen von lncRNAs, (Abb. nach [137]). In der Abbildung erkennt man die verschiedenen Funktionen von lncRNAs. In A beschrieben die genomischen Lokalisationen von lncRNAs: intergenisch, *antisense* (NAT = *natural antisense transcript*), überlappend, gegenläufig. In B erkennt man die verschiedenen Funktionen der lncRNAs (nukleär und zytoplasmatisch) die im Text genauer beschrieben werden. Funktionen im Nukleus: b1. Barr-Körperchen, b2. Verstärker, b3. Köder, b4. Signal, b5. Lenker, b6. Gerüst, b7. Enzymregulator, b8. Spleißmodulator. Funktionen im Zytoplasma: b.9.miRNA-Schwamm, b10. Proteinbindung, b11. mRNA-Bindung, b12. Extrazelluläre Sekretion, b13. smRNA-Vorläufer.

Die Gene für lncRNAs können in unterschiedlichen Positionen im Genom liegen. Im intergenischen Bereich befinden sich die lncRNAs zwischen zwei proteinkodierenden Bereichen. Sie können zudem *antisense* liegen, also gegenüber von proteinkodierenden Bereichen. NATs (*Natural Antisense Transcripts*) können komplementär oder überlappend mit protein-kodierenden oder nicht-kodierenden Transkripten vorkommen. [138] *Overlapped* bedeutet, dass die lncRNAs einen proteinkodierenden Bereich überlappen. Hierbei kann die lncRNA im intronischen oder exonischen Bereich liegen.

Alternativ können sie noch bidirektional liegen, was bedeutet, dass sie entgegengesetzt zu den proteinkodierenden Bereichen abgelesen werden. [130, 139, 140]

LncRNAs können verschiedene Funktionen übernehmen. Diese unterscheiden sich je nach Lokalisation im Nukleus oder Zytoplasma. [141] Einige ihrer Funktionen werden nachfolgend beleuchtet. Die lncRNA *Xist* (*X inactivation-specific transcript*) beispielsweise, kommt vorwiegend im Nukleus vor und agiert als Komponente des Barr-Körperchens (Abb. 1, b1). Bei weiblichen Individuen wird das zweite X-Chromosom in Heterochromatin verpackt und weitgehend inaktiviert, es entsteht das sogenannte Barr-Körperchen. [142] Beide X-Chromosomen tragen das *Xist*-Gen [143], im aktiven X-Chromosom wird die Funktion der lncRNA allerdings durch eine andere lncRNA namens *Tsix* inhibiert. [144, 145] Dies ist ein wichtiger Schritt in der Embryogenese. Neben der Beteiligung an diesem sehr wichtigen Entwicklungsschritt haben lncRNAs außerdem viele weitere Funktionen im regulären Zellablauf. Sie können beispielsweise als *enhancer* (Abb. 1, b2) agieren, also bestimmte Transkriptionsvorgänge durch direkte Bindung an die DNA modulieren. [146, 147] Sie können als *decoy* (Abb. 1, b3) Transkriptionsfaktoren einfangen, die somit nicht mehr an ihr Zielgen gelangen können. [148-150] Die Transkription von *signal* lncRNAs (Abb. 1, b4) führt dazu, dass bestimmte Prozesse in der Zelle verstärkt oder unterdrückt werden können. Teilweise agiert die *signal* lncRNA selbst als Regulationsfaktor, teilweise ist nur ihre Initiierung, Elongation oder Termination entscheidend für eine differentielle Regulation der Zellabläufe. Für diesen Regulationsmechanismus benötigt die Zelle keine Proteintranslation, er ist also sehr schnell zugänglich. [148, 151] *Guide* lncRNAs (Abb. 1, b5) wiederum können Transkriptionsfaktoren oder Proteine direkt zu ihrem Zielgen leiten. Hierbei kann das Zielgen direkt benachbart sein (*cis*), *guide* lncRNAs sind aber auch in der Lage weiter entfernte Genstrukturen zu erreichen (*trans*). [152, 153] Als *scaffold* (Abb. 1, b6), übersetzt als Gerüst, können lncRNAs mehrere Transkriptionsfaktoren binden. Es werden so Komplexe geschaffen, die erst in dieser Form ihre Funktion ausführen können. Hierbei handelt es sich beispielsweise um Ribonukleinprotein-Komplexe, welche unter anderem im Ribosom oder Spleißosom vorkommen und somit im direkten Zusammenhang mit der Translation und auch posttranskriptionellen Modifikationen stehen. [149, 154] Zusätzlich können lncRNAs direkt mit der mRNA interagieren und so zu posttranskriptionellen Modifikationen, beispielsweise beim Spleißen führen (Abb. 1, b8). [155, 156] Des Weiteren können lncRNAs bei der Enzymregulation eine Rolle spielen. So kann es durch

eine Interaktion zu einer veränderten Enzymfaltung kommen (Abb. 1, b7), welche ebenfalls direkte Einflüsse auf zelluläre Abläufe haben kann. [157]

Im Zytoplasma haben lncRNAs ebenfalls diverse Funktionsmöglichkeiten. Einige lncRNAs können als miRNA-Schwamm (*sponge*) (Abb. 1, b9) fungieren. In dieser Funktion fangen sie miRNAs auf, die dann nicht mehr an ihrem Zielgen binden können, was Einfluss auf die Proteinexpression haben kann. [158, 159] lncRNAs können außerdem direkt Proteine oder mRNAs binden und sie so unmittelbar beeinflussen (Abb. 1, b10/11). Des Weiteren können lncRNAs als *small-RNA-precursor* dienen, also als strukturelle Vorläufer von kleinen RNAs (Abb. 1, b13). Diese kleinen RNAs oder smRNAs führen dann weitere Aufgaben aus. [137] Zusätzlich können lncRNAs in Vesikeln zu anderen Zellen transportiert werden, wo sie dann die beschriebenen Funktionen ebenfalls ausüben können (Abb. 1, b12). [129, 160] Generell ist es wichtig zu erwähnen, dass lncRNAs mehrere Funktionen ausführen und dabei sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma agieren können. Sie spielen somit auf vielen verschiedenen Ebenen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression [137, 157] sowie bei der Steuerung bestimmter Signalwege und zellulären Interaktionen. [157]

1.2.2 Bedeutung von lncRNAs in Tumoren

Tumoren entstehen auf der Grundlage von genetischen Veränderungen in den Tumorzellen. Studien zufolge entstehen rund 80 % dieser Veränderungen in nicht-kodierenden Abschnitten der DNA. [161-163] Diese Mutationen können unter anderem zur Stimulation von Onkogenen oder auch zur Repression von Tumorsuppressorgenen führen. Ein Ungleichgewicht, das durch solche Veränderungen entstehen kann, kann zur Neubildung von Tumoren und auch zur Tumورprogression und Metastasenbildung beitragen. [164] Zudem gibt es Hinweise darauf, dass auch epigenetische Veränderungen eine Rolle in der Karzinogenese spielen können. [165] Diverse Studien weisen darauf hin, dass lncRNAs Teil der Schlüsselkomponente für solche epigenetischen Veränderungen sein können. [163, 166]

Weiterhin wurde herausgefunden, dass lncRNAs in Tumoren oftmals differentiell zum entsprechenden Normalgewebe exprimiert werden. Solch veränderte Expressionsraten können möglicherweise mit dem Wachstum und der Progression des Tumors in Verbindung stehen. Zusätzlich können sie zur Entstehung von Resistenzmechanismen gegenüber der jeweiligen Therapie und auch zur Metastasenbildung beitragen. [152] Auch wenn die Rolle einzelner lncRNAs noch nicht in Gänze verstanden ist, lässt sich

teilweise eine strenge Korrelation der lncRNA-Expressionsraten und der Prognose der Tumorpatienten nachweisen. [129, 164]

Abb. 2 gibt einen groben Überblick über einige lncRNAs, für die Veränderungen in unterschiedlichen Tumoren beschrieben wurden. [152, 167, 168] Hierbei können lncRNAs auf verschiedenen Ebenen eine Rolle spielen, beispielsweise bei der Diagnosestellung, als prognostische Biomarker, in Zusammenhang mit Metastasenbildung, Resistenzentwicklung oder auch als molekulare Therapieziele. [162] Im Rahmen der Diagnosestellung von Tumoren wäre beispielsweise die lncRNA *PCA3* (*Prostate cancer antigen 3*) bei der Diagnostik von Prostatakarzinomen zu erwähnen. Neben dem Nachweis des prostataspezifischen Antigens (PSA) im Blutserum, gibt es die Möglichkeit *PCA3* als spezifischen Biomarker nichtinvasiv aus Urinproben zu gewinnen. Die *PCA3*-Bestimmung kann dabei unterstützend für den Nachweis von höhergradigen Tumoren sein. [169] Hierdurch ist es möglich, die Genauigkeit der Prognose zu verbessern. Außerdem kann im Therapiemanagement die Anzahl an Prostatabiopsien zur Abschätzung des Therapieverlaufs verringert werden. [170-172] lncRNAs können somit im Rahmen der Diagnostik eingesetzt werden und im Therapieverlauf als Biomarker fungieren. Diese Möglichkeit gibt es beispielsweise auch zur Unterscheidung zwischen benignen Epithelveränderungen und Tumorzellen bei Magenkrebs. Hierbei können unter anderem die Expression der lncRNAs *AA174084* [173] oder auch *H19* [174, 175] als Marker für maligne Zellen dienen.

lncRNAs können außerdem über verschiedene Arten in der Tumorzellproliferation und -invasion involviert sein. [164] Ein Beispiel hierfür ist die lncRNA *HOTAIR*. Eine gesteigerte Expression von *HOTAIR* konnte mit einer Tumorprogression in Verbindung gebracht werden. [176] Solche Veränderungen wurden in über 20 Tumorarten entdeckt, hierzu zählen unter anderem urogenitale Karzinome, Brust- und Lungenkrebs, oropharyngeale und auch gastrointestinale Tumoren. [176-178] Vor allem im Rahmen der Forschung zu Mammakarzinomen wurde *HOTAIR* eine mögliche wichtige Rolle in der Diagnostik und Therapie zugesprochen. Hohe Expressionsraten von *HOTAIR* korrelierten in Studien mit einer erhöhten Rate an Metastasen und somit mit einer schlechteren Prognose. [179, 180] Ein Knockdown von *HOTAIR* konnte die Migration, Proliferation und Invasion der Brustkrebszellen senken. Hierbei wurde ein Expressionsanstieg von p53 beobachtet, was auf eine mögliche Interaktion hindeuten könnte. [177] Bei molekularbiologischen Untersuchungen kolorektaler Karzinome wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Auch in diesen Karzinomen korreliert die Expression

von *HOTAIR* mit der Anzahl an Lebermetastasen und so häufig auch mit einer kürzeren medianen Überlebensdauer der Karzinompatienten. [181, 182]

Jeder Patient ist aufgrund seiner Konstitution, abhängig vom Alter und seines Gesundheitsstatus individuell. Eine individuelle und exakte Prognose über den Krankheitsverlauf einer Krebserkrankung gestaltet sich daher oftmals schwierig. Durch gezieltere Untersuchungen, unter anderem auf molekularer Ebene, können allerdings teilweise prognostische Aussagen besser getroffen werden. Neben der Tumorprogression und der Metastasierungsrate, ist auch die Einschätzung des Therapieansprechens für den weiteren Therapieverlauf entscheidend. Hierbei ist ein wichtiger Punkt die mögliche Resistenzentstehung gegenüber der jeweiligen Chemotherapie. Die lncRNA *UCA1* (*urothelial cancer-associated 1*) spielt beispielsweise bei Blasenkarzinomen eine entscheidende Rolle für die Resistenz gegenüber einer Chemotherapie mit Cisplatin. Eine Überexpression von *UCA1* geht mit einer verminderten Vitalitätseinschränkung der Tumorzellen im Rahmen der Chemotherapie einher. Eine Inhibition von *UCA1* konnte somit in Studien zu einer besseren Ansprechrates der Tumorzellen auf die Therapie führen. [183] Auch andere lncRNAs wie beispielsweise *HOTAIR*, *H19*, *TUG1* oder *PRNCRI* können eine Rolle bei Therapieresistenzen von Tumorzellen spielen. [184-190]

Dieser kurze Auszug über die vielfältigen Wirkungsweisen und Einsatzmöglichkeiten von lncRNAs in verschiedenen Tumoren macht deutlich, dass lncRNAs möglicherweise wichtige Rollen bei der Diagnostik von Tumoren, bei gezielteren Prognosemöglichkeiten sowie als Zielstruktur neuer Therapieansätzen spielen können. [129, 162, 168]

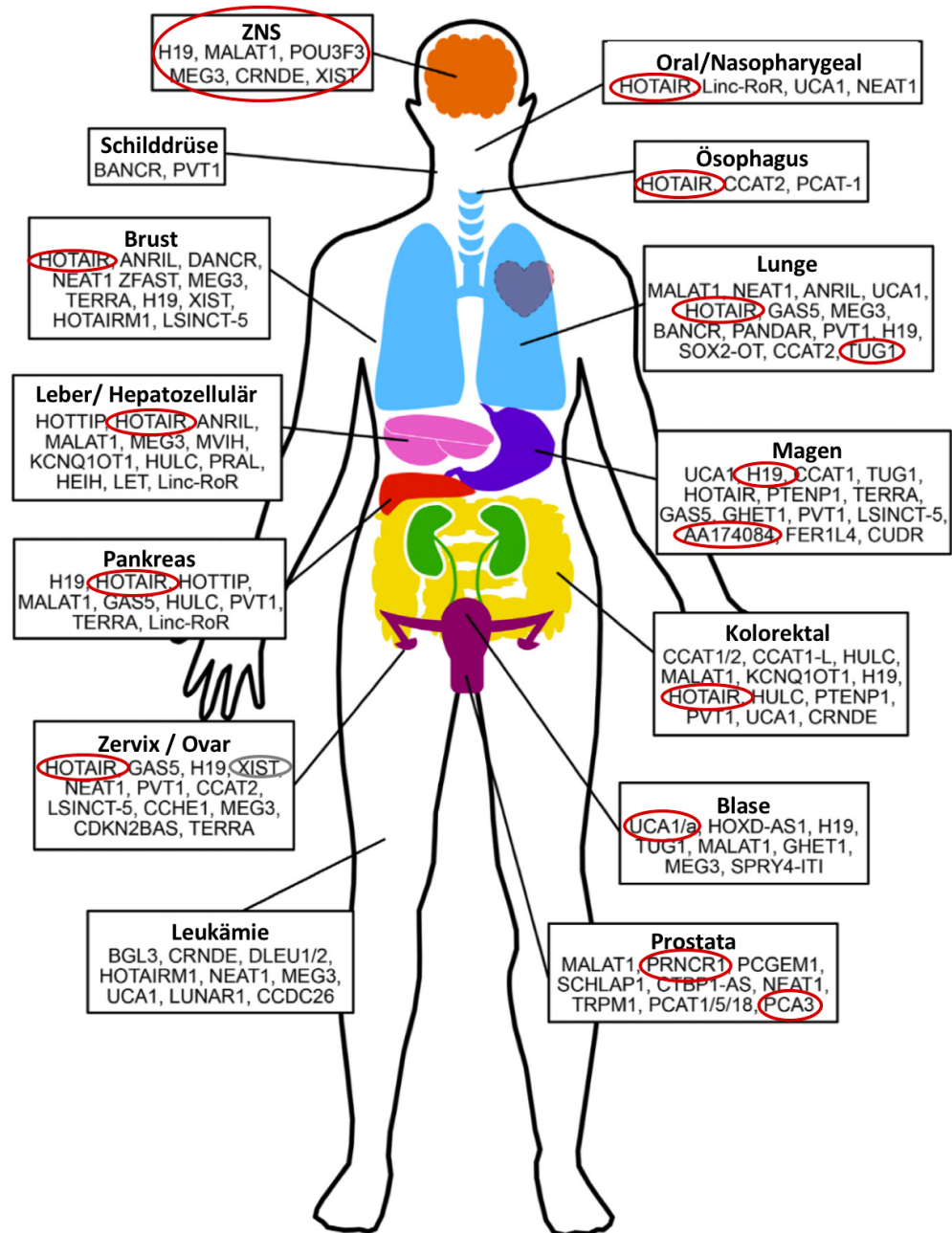


Abbildung 2: Ausgewählte Tumor-assoziierte lncRNAs bei unterschiedlichen Tumorentitäten. (Abb. modifiziert nach [152]) Rot umrandet: lncRNAs die in 1.1.2 weiter in ihrer Funktionsweise erläutert werden. Grau umrandet: lncRNAs die in weiteren Abschnitten des Texts beschrieben wurden.

1.2.3 Bedeutung von lncRNAs in Glioblastomen

lncRNAs sind im zentralen Nervensystem (ZNS) und vor allem im Gehirn sehr hoch exprimiert. [191, 192] Dabei ist die Expression von lncRNAs in verschiedenen neuroanatomischen Kompartimenten unterschiedlich, was auf die enorme Spezialisierung und Komplexität der lncRNAs hinweist. [193] Es wurde herausgefunden, dass lncRNAs bei der neuronalen Entwicklung eine Rolle spielen. Zudem konnten diverse Assoziationen zu neurologischen Erkrankungen gefunden werden. [194, 195] Auch in Bezug auf maligne Erkrankungen im Gehirn wurden Studien durchgeführt, die den Einfluss von lncRNAs weiter untersucht haben. In verschiedenen Studien wurden so unter anderem die Expressionsraten von lncRNAs in Glioblastomen im Vergleich zu nicht-neoplastischen Hirngewebe untersucht. Hierbei konnte für manche lncRNAs eine stark erhöhte Expression festgestellt werden. [196-198] Weiterhin haben Mikroarrayanalysen ergeben, dass verschiedene lncRNA-Expressionsmuster mit histologischen Subtypen von Gliomen assoziiert werden können. [199] Man beobachtete zudem auch eine Korrelation der Expression verschiedener lncRNAs mit malignem Verhalten in Gliomen. [198, 200] Diese Forschungsergebnisse geben erste Hinweise darauf, dass lncRNAs eine prognostisch signifikante Rolle in Gliomen spielen können. Weiterhin gibt es Anhaltspunkte eines Einflusses bei der Gliomentstehung. Zusätzlich könnten lncRNAs möglicherweise auch bei der Diagnostik, als Biomarker und für individuelle Therapieansätze eine Rolle spielen. [198, 201, 202]

Im Rahmen der Forschung zu lncRNAs in Glioblastomen wurden lncRNAs identifiziert, die einen Einfluss auf die Proliferation oder auch Wachstumsunterdrückung, Migration, Invasivität, Vitalität und Angiogenese von Glioblastomzellen haben. [195, 202] Einige Beispiele und Funktionsweisen können einen Überblick über die vielfältigen Wirkungsweisen der lncRNAs in Glioblastomen geben und werden nachfolgend erläutert. So wurde die lncRNA *H19* aufgrund ihrer sehr hohen Expression in Glioblastomzellen weiter untersucht. [200, 203] *H19* gilt dabei unter anderem als Vorläufer für die mikro-RNA *miR-675*. [200, 204] Über diese miRNA kann die lncRNA unter anderem auf Cadherin 13 Einfluss nehmen und so in die Zellproliferation und -migration eingreifen. [205] Über Interaktion mit der *miR-140* kann *H19* vermutlich mit dem Tumorsuppressor p53 interagieren und seine Funktion unterdrücken. [206] Zudem kann eine Herunterregulation der *miR-152* durch *H19* die Zellproliferation und -invasion fördern [207]. Über Inhibition der *miR-29a* kann *H19* außerdem Einfluss auf die Angiogenese

des Tumors nehmen. [208] Diese Wechselwirkungen der lncRNA *H19* mit den miRNAs führen, bei einer Überexpression von *H19*, vermutlich zu einer schlechteren Prognose von Glioblastompatienten.

Eine weitere lncRNA, die bei einer Überexpression zu einer schlechteren Prognose der Patienten führen kann, ist *MALAT1*. Durch eine Interaktion mit miRNAs kann *MALAT1* ebenfalls über verschiedene Wege auf die Tumorzellen Einfluss nehmen. Eine Hemmung der *miR-203* führt beispielsweise zu einer verminderten Hemmung der Thymidylat-Synthase durch die miRNA. Im Überschuss vorhanden beeinflusst die Thymidylat-Synthase die DNA-Reparatur und Replikation und kann so die Effekte von TMZ rückgängig machen. [209] Ein Knockdown von *MALAT1* kann somit zu einer gesteigerten TMZ-Sensitivität führen. [210, 211] Ähnliche Ergebnisse brachte eine Studie, die den Einfluss von *MALAT1* auf *miR-101* untersucht hat. Diese miRNA inhibiert unter anderem in Glioblastomen die Zellproliferation und -invasion und kann zusätzlich die Apoptose fördern. Diese Eigenschaften wurden *miR-101* auch schon in anderen Tumoren zugesprochen. [211, 212] *MALAT1* bindet *miR-101* und dient somit als mikro-RNA sponge. [211] Dies führt in den Glioblastomzellen zu gesteigerten Proliferations- und Invasionsraten und einer geringeren Apoptoserate. Eine hohe Expression von *MALAT1* konnte, in Folge dessen, mit einer kürzeren mittleren Überlebensdauer der Patienten assoziiert werden. [210, 213, 214]

Eine weitere lncRNA die als miRNA sponge in die Regulation von Glioblastomzellen eingreifen kann, ist die lncRNA *XIST*. Hierbei wirkt sie unter anderem auf die *miR-429*, [215] *miR-152*, [216] und *miR-137* [217]. Über diese Wege kommt es in den Glioblastomzellen zu einer gesteigerten Proliferations-, Migrations- und Invasionsrate. Ein Knockdown von *XIST* könnte somit zu einer besseren Prognose führen. Ähnlich steht es um die lncRNA *CRNDE*, welche ebenfalls im Zusammenhang mit der Glioblastomzellproliferation, -migration und -invasion und zusätzlich mit der Inhibition von Apoptosemechanismen steht. [202, 218, 219] LncRNAs wie *XIST* [220], *POU3F3* [221, 222] und wie zuvor erwähnt *H19* können zudem stimulierenden Einfluss auf die Angiogenese der Tumoren nehmen. Ein Knockdown dieser lncRNAs kann somit vielversprechend bei der Therapie von Glioblastomen sein.

Die lncRNA *MEG3* hingegen zeigt in Glioblastomen oft eine erniedrigte Expressionsrate. Hierbei liegt vermutlich eine DNA-Methylierung im Bereich des Promotors von *MEG3* vor, die zu einer Hemmung der Transkription dieser lncRNA in den Tumorzellen führt. [195, 223] *MEG3* gilt dabei als Tumorsuppressor-lncRNA, da sie unter anderem mit p53

oder MDM2 interagiert. [224, 225] Zusätzlich gibt es Hinweise auf Interaktionen von *MEG3* mit diversen miRNAs. [226] Eine niedrige Expression von *MEG3* führt somit in Glioblastomen zu einem vermehrten Tumorzellwachstum und einer verminderten Apoptoserate. [224]

Bei der Beleuchtung von lncRNAs und ihrer Rolle in Glioblastomen wird zum wiederholten Male deutlich, dass lncRNAs über sehr viele unterschiedliche Wege im zellulären Netzwerk verankert sind. Dies hat zur Folge, dass sich eine genaue Aufarbeitung der Signalwege sehr langwierig und schwierig gestalten kann. Dennoch liegt in der molekularen Signatur der Glioblastomzellen das Potential, die Tumoren besser verstehen und sie demnach gezielter therapieren zu können. Dabei sind die beschriebenen lncRNAs nur einige wenige Beispiele von lncRNAs, welche in Gliomzellen entdeckt und weiter untersucht wurden. Dieser kurze Abschnitt über die vielfältigen Wirkungsweisen von lncRNAs in Glioblastomen zeigt ihr Potential für weitere Forschungen auf. Das Ziel dieser Forschungen ist die Möglichkeit der personalisierten Medizin weiter auszubauen. Frühere Diagnosestellung, genauere Prognosevorhersage und zielgerichtete Therapiemöglichkeiten könnten in Rahmen der Therapie von Glioblastomen neue Hoffnungen geben.

1.2.4 Bedeutung der lncRNA *RAD51-AS1* in Glioblastomen

Die lncRNA *RAD51-AS1* liegt Kopf-an-Kopf mit dem DNA-Reparaturgen *RAD51* auf Chromosom 15. Diese sogenannten *antisense* Lagen gehen oft einher mit einer Interaktion zwischen den entsprechenden Genen. [227-229] Im menschlichen Körper spielt *RAD51* eine Schlüsselrolle bei der DNA-Reparatur. [230] Dabei ist *RAD51* Teil eines Multiproteinkomplexes, welcher im Rahmen der homologen Rekombination Doppelstrangbrüche reparieren kann. [231] Solche Doppelstrangbrüche entstehen unter anderem durch alkylierende Agenzien wie TMZ. [102] Diverse Studien zeigten in der Vergangenheit eine stark erhöhte Expression von *RAD51* in TMZ-resistenten Glioblastomzellen. Ein Knockdown von *RAD51* führte in weiteren Untersuchungen zu einer verbesserten Ansprechrate auf TMZ. [232-234]

Mittels Mikroarray-Expressionsanalysen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Guido Reifenberger in Zusammenarbeit mit Daniel Picard (Universitätsklinikum Düsseldorf, Klinikum für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Mark Remke) wurde die Expression von lncRNAs in parentalen und TMZ-resistenten Glioblastomzellen untersucht. [235] Hierbei stellte sich unter anderem eine stark erhöhte Expression der lncRNA *RAD51-AS1* in parentalen im Vergleich zur Expression in den zugehörigen TMZ-resistenten Glioblastomzellen dar (siehe 3.3.1, Abb. 4). Aufgrund der genomischen Kopf-an-Kopf Lage von *RAD51-AS1* und *RAD51* stellte sich die Frage, ob *RAD51-AS1* die Expression des DNA-Reparaturgens *RAD51* beeinflusst. In Glioblastomen wurde bereits andere *antisense* liegende lncRNAs beschrieben, die über eine Interaktion mit ihrem Zielgen Einfluss auf das Tumorstadium [236], die Tumorstadium und -migration [237, 238] oder auch die Sensitivität gegenüber der Strahlentherapie [238] nehmen können. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher ein möglicher Einfluss von *RAD51-AS1* auf die *RAD51* mRNA-Expression untersucht werden.

1.3 Ziele dieser Arbeit

Glioblastome sind die häufigsten bösartigen primären Hirntumoren im Erwachsenenalter. Diese sehr aggressiven Hirntumoren sind somit von großer Bedeutung in der Neuroonkologie. Eine Schwierigkeit bei der Therapie von Glioblastomen ist das unterschiedliche und meist nur sehr begrenzte Ansprechen der Tumorzellen auf die gängige kombinierte Radiochemotherapie mit Temozolomid. Die Glioblastomzellen sind entweder primär resistent oder entwickeln im Laufe der Therapie Resistenzmechanismen gegenüber der Radiochemotherapie und limitieren so den Behandlungserfolg für die Patienten, was auch für die behandelnden Ärzte eine große Herausforderung darstellt. In jüngster Zeit wurde herausgefunden, dass jeder Tumor eine bestimmte molekulare Signatur aufweist und so die Möglichkeit einer patientenkonzentrierten, individuelleren Diagnostik, Prognostik und möglicherweise auch Therapie bietet. In den letzten Jahren konzentrierte sich die Forschung auf diese molekularen Veränderungen, die unter anderem eine Grundlage der WHO-Klassifikation aus dem Jahre 2016 wurden. Die stetige Weiterentwicklung und Forschung in diesen Bereichen ist essentiell für eine Verbesserung der Diagnose-, Prognose- und Therapiemöglichkeiten für Glioblastompatienten.

Folgende Fragestellungen sollen in der Arbeit behandelt werden:

1. Wie ist die Expression der lncRNA *RAD51-AS1* und des *RAD51* Gens auf mRNA-Ebene in Glioblastomzelllinien und Glioblastomen? Gibt es Hinweise auf eine mögliche Regulation von *RAD51* durch *RAD51-AS1*?
2. Gibt es Effizienzunterschiede der siRNA-basierten Knockdowns von ausgewählten lncRNAs mittels einzelner siRNAs und siRNA-Pools?
3. Haben ausgewählte Prognose-assoziierte lncRNAs Einfluss auf die Vitalität oder auf die Proliferations-, Wachstums- und Apoptoseraten von Glioblastomzellen?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Die für diese Arbeit verwendeten Zelllinien sind menschlichen Ursprungs und stammen aus Glioblastomen. Die folgenden Zelllinien wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC) aus Manassas, Virginia bezogen: A172, CCF-STTG1, T98G, U87MG und U251MG. Die Glioblastomzelllinien LN18, LNT229 und LN308 wurden freundlicherweise über Herrn Prof. Dr. Michael Weller, Universitätsspital Zürich, Schweiz von Frau Dr. Monika Hegi, Lausanne, Schweiz zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie TP365MG wurde freundlicherweise von Professor V. Peter Collins, Cambridge, UK zur Verfügung gestellt. Zudem wurde DNA-Gliomstammzelllinien GS3, GS5, GS9, GS11 und GS13 freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Katrin Lamszus, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Kommerziell erhältliche RNA-Proben

In der nachfolgenden Tabelle 1 sind alle kommerziell erhältlichen RNA Proben gelistet, die für diese Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 1: Kommerziell erhältliche RNA-Proben, die für diese Arbeit verwendet wurden.

RNA-Probe	Verwendete Abkürzung	Bestellnummer	Hersteller
Human Adult Normal Tissue Total RNA- Brain	HBB	R1234035-50- BC	BioChain, Newark, CA
Human Adult Normal Tissue Total RNA- Brain- Cerebral Cortex	CeCo	R1234042-10- BC	BioChain, Newark, CA
Human Adult Normal Tissue Total RNA- Brain- Corpus Callosum	CoCa	R1234045-10- BC	BioChain, Newark, CA

Material

Human Adult Normal Tissue Total RNA- Brain- Frontal Lobe	FL	R1234051-50- BC	BioChain, Newark, CA
Human Adult Normal Tissue Total RNA- Brain- Occipital Lobe	OL	R1234062-50- BC	BioChain, Newark, CA
Human Adult Normal Tissue Total RNA- Brain- Parietal Lobe	PL	R1234066-50- BC	BioChain, Newark, CA
Human Adult Normal Tissue Total RNA- Brain- Temporal Lobe	TL	R1234078-50- BC	BioChain, Newark, CA
Human brain total RNA, Ambion™	HBA	AM7962	Thermo F. Scientific Corp., Waltham, MA
Human Fetal Normal Tissue Total RNA- Brain	HFB	R1244035-50- BC	BioChain, Newark, CA
Total RNA, Brain, Human	HBS	540005	Agilent/Stratagene, Santa Clara, CA
Universal Human Reference RNA	HU	740000	Agilent/Stratagene, Santa Clara, CA

2.1.3 Proben aus der ZNS-Tumorgewebebank Düsseldorf (CNS-TuBa)

Für diese Arbeit wurden Tumorgewebebeben aus der ZNS-Tumorgewebebank Düsseldorf verwendet. Diese umfassten Proben von fünf diffusen Astrozytomen (WHO-Grad II), fünf anaplastischen Astrozytomen (WHO-Grad III) und 23 Glioblastomen (WHO-Grad IV). Die diffusen und anaplastischen Astrozytome zeigten alle eine IDH1-R132H Mutation und wurden gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation als IDH-mutierte Astrozytome klassifiziert. Alle 23 Glioblastome waren IDH-Wildtyp Tumoren. Die Nutzung dieser Proben für dieses Promotionsprojekt wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Studennummer: 5330: Role of long non-coding RNAs in glioma growth and resistance to temozolomid).

2.1.4 siRNAs

In der nachfolgenden Tabelle 2 sind alle einzelnen siRNAs und siRNA-Pools gelistet, die für diese Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 2: Einzelne siRNAs und siRNA-Pools, die für diese Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 2: Endogene siRNAs und siRNA-Tools, die für diese Arbeit verwendet wurden.

TriFECTa™ Dicer-Substrate RNAi Kit		
IDT (Integrated DNA Technologies), Coralville, IA		
siRNA	Zielsequenz	Bestellnr.
Hs.Ri. <i>RAD51-AS1</i> 13.1	5'-CAUUGAAUUUCAUAACCUAAACCGT-3'	202086868
Hs.Ri. <i>RAD51-AS1</i> 13.2	5'-GGUUAACAUUUAGUUCAGGAUAUGAA-3'	202086867
Hs.Ri. <i>RAD51-AS1</i> 13.3	5'-GAAGGUUACAUUUAGUUCAGGAUAT-3'	202558999
HPRT-S1 DS Positive control		187694765
TYE 563 DS Transfection control		192988901
NC 1		198269681
FlexiTube GeneSolution siRNA,		
Qiagen GmbH, Hilden		
siRNA	Zielsequenz	Bestellnr.
Hs_LOC100505648_1	5'-CCGTATCGTGGTTTACCAGAA-3'	20160120522
Hs_LOC100505648_2	5'-AACGAACTAXATGATTAAAGA-3'	20160120521
Hs_LOC100505648_3	5'-AAGATGGATAGAAGTGGGAAA-3'	20160120520
Hs_LOC100505648_4	5'-TAGGGTAGTATGGGCATGGAA-3'	20160120519
siPOOLS™		
siTOOLS Biotech, Planegg / Martinsried		
siRNA	Bestellnummer	
siTOOLS <i>RAD51-AS1</i>	100505648-1-001	
siTOOLS Negative Control	100505648-1-020	

2.1.5 Primersequenzen

Für diese Arbeit wurden 25 verschiedene Primerpaare für lange nicht-kodierende RNAs selber entworfen und getestet. Das Primerdesign erfolgte mit Hilfe des Primer3 Programms (siehe Tabelle 6) und die Primer wurden über die Firma Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen, bestellt. In der nachfolgenden Tabelle 3 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Primer mit ihren Nukleotidsequenzen gelistet. (F, Vorwärtsprimer; R, Rückwärtsprimer)

Tabelle 3: Primersequenzen, die für diese Arbeit verwendet wurden.

Zielgen	Primer	Primersequenz	Fragment- größe (bp)
<i>ARF1</i>	F1	5'-GACCACGATCCTCTACAAGC-3'	111
	R3	5'-TCCCACACAGTGAAGCTGATG-3'	
<i>BRCA2</i>	F1	5'-TTCATGGAGCAGAACTGGTG-3'	164
	R1	5'-CGATGATAAGGGCAGAGGAA-3'	
<i>CPEB-ASI</i> <i>ENSG00000259462</i>	F1	5'-CATCTTTCAAGAGACTTGGAACAG-3'	155
	R1	5'-CTGCCTTGGTTTGAGTCTTTGCT-3'	
	F2	5'-CCAAGGCAGTCTTCTGGTTT-3'	230
	R2	5'-CCGAGATGCAGAGGATGCTA-3'	
<i>AC145124.1</i> <i>ENSG00000255495</i>	F3	5'-GATCGGAATGTGGCTCAAGT-3'	790
	R3	5'-TTGCTGTGGATTCTCAGGTG-3'	
<i>AC011899.2</i> <i>ENSG00000233038</i>	F1	5'-GAGCGTCTCTCCTCTGTGT-3'	185
	R1	5'-GGTTCCACTCTCAAGGCATTT-3'	
	F6	5'-GTGCTGCTTAACCGTGGAGT-3'	215
	R6	5'-CAGATCTGCCATCTCCTCCT-3'	
<i>TMEM106A-ASI</i> <i>ENSG00000236383</i>	F1	5'-TGGAACCCTCTGAGGAAGAA-3'	229
	R1	5'-TTCTTTCTGCTGCAGCTCCT-3'	
	F2	5'-CATGAACCCATGCCAATCTA-3'	151
	R2	5'-TGCTGAGAAGATGTGGTTGC-3'	
<i>AL109615.3</i> <i>ENSG00000237686</i>	F1	5'-TCGGGTGTGTGTGTACGTCT-3'	160
	R1	5'-AGCTGTCCTCAAAGCAGGAA-3'	
	F2	5'-TCTCGCCAAGGCTAGGATAA-3'	242
	R2	5'-TGCCTCATGAATCTGGAAGA-3'	
<i>AC034243.1</i> <i>ENSG00000253404</i>	F1	5'-CCACCTCAGAATTCCTTCC-3'	241
	R1	5'-CACCTCCGCTCTCAAGTAG-3'	
	F2	5'-CCGCCCACCTCAGAATTCCTTCC-3'	247
	R2	5'-TCCCACCCTCCGCTCTCAAGTAG-3'	

Material

<i>AC068888.1</i> <i>ENSG00000257337</i>	F1	5'-GTACTTGTCCCGGTGCTTG-3'	154
	R1	5'-ATGACCTTGAACGGAGTGCT-3'	
	F3	5'-GTAGGGCAGGTTTGAGTCGT-3'	217
	R3	5'-TCAGGGCCTTCATTATCCTG-3'	
	F4	5'-CTTGCCACAGGGAAGAAGAG-3'	593
	R4	5'-CGTAAGTGTTGAAGGCTGCTC-3'	
<i>AC055874.1</i> <i>ENSG00000259446</i>	F1	5'-AAAGTTTGCAACTCCCTGGAT-3'	167
	R1	5'-CATCGTTCCTACTGACACCAAA-3'	
	F2	5'-CTGCTCCAATTCACAAACAAA-3'	122
	R2	5'-CATCGTTCCTACTGACACCAAA-3'	
<i>AL807761.3</i> <i>ENSG00000226047</i>	F1	5'-TGCTTACTCCAGGAGAAGCCA-3'	155
	R1	5'-AGCTGTGAAGGATCAAGTCCTAC-3'	
	F2	5'-GAAGCCAGCTTCCATGTTGT-3'	161
	R2	5'-TTGCCGTATCAATGAAGAAAGT-3'	
	F3	5'-TGCTTACTCCAGGAGAAGCCAGCT-3'	158
	R3	5'-AAAGTAGGACTTGATCCTTCACAGCT-3'	
<i>AC090617.5</i> <i>ENSG00000263050</i>	F1	5'-AGGAGTTGGTGTGATCTTCCA-3'	186
	R1	5'-TCGGACAGGCTGCTGCAT-3'	
<i>AC099343.4</i> <i>ENSG00000271646</i>	F1	5'-TCCGCTCCATTTAGGAGCTA-3'	195
	R1	5'-TGCTCCAGCATAAAGCCTCT-3'	
<i>MGMT</i>	F1	5'-TGCACAGCCTGGCTGAATG-3'	102
	R1	5'-GGTGAACGACTCTTGCTGGAAA-3'	
<i>MSH6</i>	EX1-F	5'-AAGGCGAAGAACCTCAACG-3'	399
	EX3-R	5'-TGAGGGCTCATCACAAACTG-3'	
	EX2-F	5'-TTTGATGACAGCCCAACAAG-3'	480
	EX2-R	5'-CTTTCTCGCGGATGAATGTT-3'	
<i>p21</i>	F3	5'-GGAAGACCATGTGGACCTGT-3'	178
	R3	5'-GGATTAGGGCTTCCTCTTGG-3'	
<i>RAD51-AS1</i>	F1	5'-CGTTCAACACAGACCACCAG-3'	200
	R1	5'-AGAAGCATCCGCAGAAACCT-3'	
	F2	5'-CGTTCAACACAGACCACCAG-3'	163
	R2	5'-GCTAATAGTCCAGCTGCGATG-3'	
	F3	5'-CCTGCGCGCTAACCCAAG-3'	151
	R3	5'-ACCCGCCGGCGATGCATG-3'	
<i>RAD51</i>	F1	5'-CGTTCAACACAGACCACCAG-3'	178
	R1	5'-AGAAGCATCCGCAGAAACCT-3'	

Material

<i>UBXN10-AS1</i> <i>ENSG00000225986</i>	F1	5'-CAGCGGTTGCATAGGTCCT-3'	120
	R1	5'-GAGCAGAAACACCACCACTGA-3'	
Myko- plasmentest	Myc F1	5'-ACACCATGGGAGCTGGTAAT-3'	270
	Myc R1	5'-CTTCWTCGACTTYCAGACCCAAGGCAT-3'	
	Myc F2	5'-GTTCTTTGAAAAGTGAAT-3'	200
	Myc R2	5'-GCATCCACCAWAWACTCT-3'	

2.1.6 Chemikalien, Reagenzien, Kits

In der nachfolgenden Tabelle 4 sind alle Chemikalien, Reagenzien, Enzyme und Kits gelistet, die für diese Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 4: Chemikalien, Reagenzien, Enzyme und Kits, die für diese Arbeit verwendet wurden.

Kits, Chemikalien, Reagenzien, Enzyme	Bestellnummer	Hersteller
5x Strand Buffer	1633544	Invitrogen, Carlsbad, CA
Bovine Serum Albumin 1 mg/ml	1032414	Invitrogen, Carlsbad, CA
Caspase-Glo® 3/7 Assay	0000256594	Promega Corporation, Madison, WI
Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescence)	10852900	Sigma Aldrich GmbH, (Roche), (Merck) Darmstadt
CellEvent™ Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit	11390952	Thermo F. Scientific Corp., Waltham, MA
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	0000094150	Promega Corporation, Madison, WI
dATP 100mM	DTAP3900	Bio-Budget GmbH, Krefeld
dCTP 100 mM	DCTP3900	Bio-Budget GmbH, Krefeld
dGTP 100mM	DGTP3900	Bio-Budget GmbH, Krefeld
Dithiothreitol 0,1 M	1452675	Thermo F. Scientific Corp., Waltham, MA
DMEM, high glucose pyruvate	11965-092	Thermo F. Scientific Corp., Waltham, MA
DPBS	1839839	Life Technologies, Carlsbad, CA
dTTP 100mM	DTTP3900	Bio-Budget GmbH, Krefeld
FCS south american	42G6183K	Thermo F. Scientific Corp., Waltham, MA
GoTaq® qPCR Master Mix	00000193068	Promega Corporation, Madison, WI
HotStarTaq DNA Polymerase	203203	Qiagen GmbH, Hilden
Lipofectamine® RNAiMAX Reagent	1851176	Thermo F. Scientific Corp., Waltham, MA

Material

Lipofectamine® 2000 Reagent 1mg/ml	1642377	Thermo F. Scientific Corp., Waltham, MA
Midori Green Advance	617004	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
my-Budget 100 bp + 1,5 kb DNA-Leiter	85-2150	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld
OPTI-MEM I reduced serum medium	31985047	Thermo F. Scientific Corp., Waltham, MA
Penicillin/ Streptomycin (5000 U/ml)	15070063	Thermo F. Scientific Corp., Waltham, MA
Platinum® SYBR® Green qRT- PCR SuperMix-UGD	11744100	Thermo F. Scientific Corp., Waltham, MA
Random Hexamer 1,5 µg/ml	330947	Gene Link, Inc. Hawthorne, NY
Ribolock RNase Inhibitor 40 U/µl	00244718	Thermo F. Scientific, Waltham, MA
ROX Reference Dye	1586848	Thermo F. Scientific Corp., Waltham, MA
Superscript reverse Transkriptase 200 U/µl	1674426	Thermo F. Scientific Corp., Waltham, MA
Taq DNA Polymerase	1817560	Thermo F. Scientific Corp., Waltham, MA
TaqMan Gene Expression Master Mix	1106121	Applied Biosystems, Foster City, CA
TaqMan Non-coding RNA Assays <i>RAD51-ASI</i>	P150917- 007 C01	Applied Biosystems, Foster City, CA
Trypsin-EDTA (0,05%)	25300062	Thermo F. Scientific Corp., Waltham, MA
TRIzol™ Reagent	15596018	Thermo F. Scientific Corp., Waltham, MA
Qubit™ RNA BR Assay Kit	Q10211	Thermo F. Scientific Corp., Waltham, MA

2.1.7 Geräte und Software

In der nachfolgenden Tabelle 5 sind die wichtigsten Geräte gelistet, die für diese Arbeit verwendet wurden. Tabelle 6 zeigt die verwendeten Software-Programme.

Tabelle 5: Geräte, die für diese Arbeit verwendet wurden.

Gerät	Hersteller
ApoTome.2	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Biometra Trio (PCR Cycler)	Analytic Jena AG, Jena
CB160 (Zellkulturinkubator)	Binder GmbH, Tuttlingen
MoFlo™ XDP, Flow Cytometer Cell Sorter	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
NanoDrop® ND-1000 Spectrometer	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Perfect Spin 24R Refrigerated microcentrifuge	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Qubit ® 2.0 Fluorometer	Thermo F. Scientific Corp., Waltham, MA
RotoFix 32	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Thermo F. Scientific Corp., Waltham, MA
Vi-CELL™ XR Cell viability analyzer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Tabelle 6: Software Programme, die für diese Arbeit verwendet wurden.

Software	Hersteller /Quelle
GraphPad Prism v5.04	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA
GIMP v2.8 (GNU Image Manipulation Program)	http://gimp.org
StepOne Software v2.3	Thermo F. Scientific Corp., Waltham, MA
Summit Software (5.1.0)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Multimode Analysis Software	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Primer3web v4.1.0	http://primer3.ut.ee
ViCell XR v2.03	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

2.2 Methoden

2.2.1 RNA-Extraktion

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus den Zelllinien erfolgte mit TRIzol™ nach Angaben des Herstellers. Abhängig von der Größe des RNA-Präzipitats wurde die extrahierte RNA in 25-50 µl RNase freiem H₂O gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem NanoDrop® ND-1000 Spektrometer oder mit dem Qubit® 2.0 Fluorometers unter Verwendung des Qubit™ RNA BR Assay Kits. Zur weiteren Überprüfung der gewonnen RNA wurde eine Gelelektrophorese in einem 1,5 %tigem Agarosegel durchgeführt.

2.2.2 cDNA-Synthese

Für weitere Experimente wurde spezifische komplementäre DNA (cDNA) aus der extrahierten Gesamt-RNA hergestellt. Hierzu wurden zunächst 3 µg RNA in 30,4 µl RNase freiem H₂O gelöst. Dieser erste Lösungsansatz wurde 5 Minuten lang bei 70 °C auf dem Heizblock erhitzt und anschließend auf Eis gelagert.

Der zweite Lösungsansatz für eine RNA-Probe bestand aus:

Dithiothreitol 0,1 M (DTT)	0,4 µl
Ribolock RNase Inhibitor 40 U/µl	1,0 µl
Bovine Serum Albumin 1 mg/ml	1,7 µl
2 mM dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	2,5 µl
Random Hexamer 1,5 µg/ml	3,0 µl
5x Strand Buffer	10,0 µl
Superscript reverse Transkriptase 200 U/µl	1,0 µl
gesamt	19,6 µl

Die beiden Lösungsansätze wurden zusammen pipettiert und anschließend auf dem Heizblock 50 Minuten bei 42 °C und nachfolgend 10 Minuten bei 80 °C erhitzt.

Anschließend wurde die cDNA 1:10, 1:20, 1:25 oder 1:50 in RNase freiem H₂O verdünnt.

2.2.3 Endpunkt-PCR

Für die Vervielfältigung gezielter Abschnitte der cDNA wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Hierfür wurden Primer verwendet, die den zu

Methoden

amplifizierenden cDNA-Abschnitt eingrenzen. Die 100 μM Primer-Stammlösung wurden zunächst 1:10 in RNase freiem H_2O verdünnt.

Für die PCR wurde folgender Lösungsansatz verwendet:

cDNA-Probe	1,0 μl
Vorwärts Primer Zielgen 10 μM	1,0 μl
Rückwärts Primer Zielgen 10 μM	1,0 μl
10 x PCR Puffer	2,5 μl
2 mM dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	2,5 μl
HotStarTaq DNA-Polymerase 5 U/ μl	0,125 μl
(Optional: Faktor Q)	(5,0 μl)
RNase freies H_2O	<i>ad</i> 25,0 μl

Die Proben wurden mittels Thermozykler unter folgenden Bedingungen erhitzt:

95 °C	15 min	x 30 Zyklen	Aktivierung der Polymerase
95 °C	30 s		Denaturierung
58 °C	30 s		Primerhybridisierung
72 °C	30 s		Elongation
72 °C	5 min		abschließende Elongation
4-8 °C	∞		eventuell Kühlen

Die optimale Temperatur der Primerhybridisierung kann abhängig von der Primerlänge und Nukleotidzusammensetzung unterschiedlich sein und wurde für jedes Primerpaar zwischen 55 °C - 65 °C optimiert. Zur weiteren qualitativen Überprüfung des PCR-Produktes wurde zudem eine Gelelektrophorese in einem 1,5 %tigem Agarosegel durchgeführt.

2.2.4 Echtzeit-RT-PCR

Die Echtzeit-RT-PCR ist eine Methode zur Quantifizierung von vervielfältigten DNA-Produkten. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt, um die Echtzeitmessung durchzuführen. Beide Ansätze basieren auf Fluoreszenzfarbstoffen, die bei exponentiell steigendem PCR-Produkt eine erhöhte Intensität des Fluoreszenzsignals zeigen. Es wurde zum einen der Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UGD verwendet. Dieser enthält einen interkalierenden Farbstoff, der nach Einlagerung in die DNA-Doppelhelix fluoresziert. Mit steigender PCR-Produktmenge steigt auch die mögliche Interkalation und somit die messbare Intensität des Fluoreszenzsignals.

Der Lösungsansatz für die Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UGD Proben war wie folgt:

Matrize (cDNA)	5,00 µl
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (2x)	12,50 µl
Vorwärts Primer (10 µM)	0,75 µl
Rückwärts Primer (10 µM)	0,75 µl
ROX Reference Dye	0,50 µl
RNase freies H ₂ O	5,50 µl
gesamt	25,00 µl

Als weitere Methode wurde die TaqMan®-PCR verwendet. Hierfür wurde eine TaqMan® Sonde benutzt, welche sich an die DNA anlagert und aus einem *Quencher* am 3'-Sondenende und einem verknüpften Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende der Sonde besteht. Bei der Vervielfältigung der DNA wird durch die Taq-Polymerase diese Verknüpfung gelöst. Bei der Trennung des *Quenchers* vom Farbstoff entsteht eine gesteigerte Fluoreszenz, welche in Echtzeit messbar ist.

Der Lösungsansatz für die TaqMan® Proben war wie folgt:

Matrize (cDNA)	5,00 µl
TaqMan™ Gene Expression Assay (20x)	1,25 µl
TaqMan™ Gene Expression Mastermix (2x)	12,50 µl
RNase freies H ₂ O	6,25 µl
gesamt	25,00 µl

Die Proben wurden in Duplikaten in einer 96 Well-Zellkulturplatte gemessen. Die Echtzeit-RT-PCR erfolgte mit einem StepOnePlus™ Gerät und verlief unter folgenden Bedingungen:

50 °C	2 min		UNG-Inkubation
95 °C	10 min		Aktivierung der <i>Taq</i> DNA-Polymerase
95 °C	15 s		Denaturierung
60 °C	1 min	x 40 Zyklen	Primerhybridisierung und Elongation

Die Ergebnisse wurden mithilfe der StepOne™ Software in *Threshold Cycle*, (C_T)-Werte (Zyklus, bei dem die gemessene Fluoreszenz zum ersten Mal die Hintergrund-Fluoreszenz überschreitet) konvertiert und mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode ausgewertet. [239] Dabei diente die Expression von *ARF1* als Referenz und die *Human Universal Reference* RNA (HU) als Kalibrator. Für jede Probe wurde zunächst der Mittelwert der C_T -Werte der beiden Duplikate für das Zielgen und das Referenzgen gebildet. Anschließend wurde die Differenz zwischen dem C_T -Wert des Zielgens und des Referenzgens bestimmt ($\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen}$). Zur Normalisierung verschiedener Echtzeit-RT-PCR Läufe wurde der ΔC_T -Wert des Kalibrators vom ΔC_T -Wert der jeweiligen Probe abgezogen ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Probe} - \Delta C_T \text{ Kalibrator}$). Durch Entlogarithmierung der $\Delta\Delta C_T$ -Werte ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) wurde die Expression der zu untersuchenden RNA in der Kalibratorprobe gleich eins gesetzt.

2.2.5 Kultivierung der Glioblastomzelllinien

Die Aussaat der Glioblastomzellen erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen in 10 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) versetzt mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (Vollmedium). Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ in einem Brutschrank.

Die Zellen wurden zweimal wöchentlich bei einer Konfluenz von 80-90 % passagiert. Das Medium wurde mit einer Glaspasteurpipette abgesaugt und die Zellen mit 10 ml Dulbeccos's Phosphate Buffered Saline (DPBS) gewaschen. Durch Zugabe von 2 ml 0,5 % Trypsin-EDTA und kurzer Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen vom Boden der Flasche gelöst. Durch Zugabe von 8 ml Vollmedium wurde das Trypsin neutralisiert. Die gelösten Zellen wurden in ein 15 ml Falcon pipettiert und anschließend 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Vollmedium gelöst und 700 µl davon in ein ViCELL™-Reaktionsgefäß zur Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe des ViCELL™-XR-Cell-Counter pipettiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgt über eine Trypanblaufärbung. Bei der Passagierung der Zellen wurden jeweils 10⁶ Zellen in die 75 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät.

Die Aufbewahrung der Glioblastomzelllinien erfolgte tiefgefroren kurzfristig in einem -80 °C Gefrierschrank und langfristig in flüssigem Stickstoff. Zur Vorbereitung wurden die Zellen wie zuvor beschrieben mit DPBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA gelöst und anschließend zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in Vollmedium, welches zusätzlich mit 10 % DMSO versetzt war, gelöst. 1,8 ml der Zellsuspension wurden jeweils in ein NUNC™-Röhrchen pipettiert und anschließend zunächst für 24 h bei -20 °C und danach bei -80 °C bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert. Für die Rekultivierung der Zellen wurden diese auf Eis aufgetaut. Die gelösten Zellen konnten anschließend in eine 75 cm²-Zellkulturflaschen pipettiert und mit 8 ml Vollmedium versetzt im Brutschrank inkubiert werden.

2.2.6 Mykoplasmentestung der Glioblastomzelllinien

Mykoplasmen sind parasitäre Bakterien, die intrazellulär und extrazellulär leben und zu Kontaminationen in der Zellkultur führen können. Zur regelmäßigen Untersuchung der verwendeten Zelllinien wurden PCR-Analysen zum Ausschluss von Mykoplasmen durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden 200 µl Überstand des Mediums aus den Zellkulturflaschen in ein separates Reaktionsröhrchen pipettiert. Anschließend erfolgte die PCR zum Ausschluss oder Nachweis von Mykoplasmen.

Methoden

Der erste Lösungsansatz für die Mykoplasmenanalyse war wie folgt:

Mediumüberstand / Positivkontrolle	5,00 µl
10 x Puffer	2,50 µl
2 mM dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	2,50 µl
Myc Vorwärtsprimer F1 (20 µM)	0,25 µl
Myc Rückwärtsprimer R1 (20 µM)	0,25 µl
50 mM MgCl ₂	1,50 µl
Taq DNA-Polymerase	0,10 µl
RNase freies H ₂ O	12,90 µl
gesamt	25,00 µl

Die Proben wurden anschließend mittels Thermozykler unter folgenden Bedingungen erhitzt:

94 °C	5 min	x 35 Zyklen	initiale Denaturierung
94 °C	30 s		Denaturierung
55 °C	2 min		Primerhybridisierung
72 °C	1 min		Elongation
72 °C	5 min		abschließende Elongation
4-8 °C	∞		Eventuell Kühlen

Dieses PCR-Produkt wurde für den zweiten Lösungsansatz weiterverwendet:

1. PCR-Produkt	1,00 µl
10 x Puffer	1,50 µl
2 mM dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1,50 µl
Myc Vorwärtsprimer F2 (20 µM)	0,15 µl
Myc Rückwärtsprimer R2 (20 µM)	0,15 µl
50 mM MgCl ₂	1,50 µl
Taq DNA-Polymerase	0,10 µl
RNase freies H ₂ O	9,10 µl
gesamt	15,00 µl

Dieser zweite Lösungsansatz wurde anschließend erneut unter folgenden Bedingungen mittels Thermozykler erhitzt:

94 °C	5 min	x 30 Zyklen	initiale Denaturierung
94 °C	30 s		Denaturierung
55 °C	2 min		Primerhybridisierung
72 °C	1 min		Elongation
72 °C	5 min		abschließende Elongation
4-8 °C	∞		eventuell Kühlen

Das Produkt des zweiten PCR-Durchlaufs wurde anschließend auf einem 2 %igem Agarosegel aufgetragen und die Banden interpretiert. Bei positivem Mykoplasmenbefund lag das Amplifikationsprodukt bei ca. 200 Basenpaaren. Es wurde sichergestellt, dass alle verwendeten Zelllinien Mykoplasmen-frei waren.

2.2.7 Transfektion von Glioblastomzellen mit einzelnen siRNAs

Zur Herunterregulation von lncRNAs wurden die Gliomzellen mit einzelnen siRNAs transfiziert. Dazu wurden die Zellen je nach weiterführendem Experiment 24 h vor Transfektion in 96, 24 oder 6 Well-Zellkulturplatten in DMEM mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin ausgesät (Zellzahl und Volumina siehe Tabelle 7). Die Zellen wurden mit je 10 nM der entsprechenden siRNA gegen *RAD51-AS1* transfiziert. Die Negativkontrolle diente zum Nachweis transfektionsbedingter Veränderungen. Hierbei handelte es sich um eine siRNA die mit keiner Sequenz im Transkriptom von Säugerzellen (Qiagen) bzw. von Mensch, Maus und Ratte interagiert (Trifecta). Nachfolgend sind die beiden Transfektionsprotokolle der verwendeten einzelnen siRNAs aufgeführt.

2.2.7.1 FlexiTube GeneSolution siRNA, Qiagen

Das Protokoll zur Transfektion von Gliomzellen mit einzelnen siRNAs der Firma Qiagen im 24 Well-Zellkulturplattenformat lautete wie folgt:

Verdünnungsansatz A:

Transfektion	Lipofectamine® 2000	Opti-MEM™
1. 10 nM siRAD51-AS1	1 µl	49 µl
2. 10 nM siNC Negative Control siRNA FlexiTube siRNA	1 µl	49 µl
3. Lipofectamine Kontrolle	1 µl	49 µl
4. MOCK-Ansatz	0 µl	50 µl

Verdünnungsansatz B:

Transfektion	siRNA oder siNC	Opti-MEM™
1. 10 nM siRAD51-AS1	1 µl	49 µl
2. 10 nM siNC Negative Control siRNA FlexiTube siRNA	1 µl	49 µl
3. Lipofectamine Kontrolle	0 µl	50 µl
4. MOCK-Ansatz	0 µl	50 µl

2.2.7.2 TriFECTa™ Dicer-Substrate RNAi Kit, IDT

Das Protokoll zur Transfektion von Gliomzellen mit einzelnen siRNAs der Firma IDT im 24 Well-Zellkulturplattenformat lautete wie folgt:

Verdünnungsansatz A:

Transfektion	Lipofectamine® 2000	Opti-MEM™
1. 10 nM siRAD51-AS1 s1	1 µl	49 µl
2. 10 nM siRAD51-AS1 s2	1 µl	49 µl
3. 10 nM siRAD51-AS1 s3	1 µl	49 µl
4. NC1 negative control duplex	1 µl	49 µl
5. HPRT-S1 DS positive control	1 µl	49 µl
6. TYE 563 DS Transfection control	1 µl	49 µl
7. Lipofectamine® 2000	1 µl	49 µl
8. MOCK-Ansatz	0 µl	50 µl

Verdünnungsansatz B:

Transfektion	siRNA, siNC oder Kontrolle	Opti-MEM™
1. 10 nM si <i>RAD51-AS1</i> s1	0,25 µl	49,75 µl
2. 10 nM si <i>RAD51-AS1</i> s2	0,25 µl	49,75 µl
3. 10 nM si <i>RAD51-AS1</i> s3	0,25 µl	49,75 µl
4. NC1 negative control duplex	0,25 µl	49,75 µl
5. HPRT-S1 DS positive control	0,25 µl	49,75 µl
6. TYE 563 DS Transfection control	0,25 µl	49,75 µl
7. Lipofectamine® 2000	0,25 µl	49,75 µl
8. MOCK-Ansatz	0,00 µl	50,00 µl

Bei beiden Ansätzen der zwei Hersteller wurden die Verdünnungsansätze A und B für die siRNA-Transfektionen jeweils 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann zusammen pipettiert und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Transfektion der Glioblastomzellen wurde zunächst das Vollmedium durch 400 µl DMEM mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum ersetzt. Nach der 20-minütigen Inkubationszeit wurde der Lösungsansatz A+B (100 µl insgesamt) auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden dann im Brutschrank bei 37 °C, in feuchter Atmosphäre und 5 % CO₂ bis zu 72 h nach Transfektion inkubiert. Je nach Versuchsansatz wurde das Medium 6 h nach Transfektion durch frisches DMEM mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum ersetzt. In Tabelle 7 können die Veränderungen der verschiedenen Ansätze je nach Format der Zellkulturplatte eingesehen werden.

Tabelle 7: Zellzahl und Volumina der ausgesäten Zellen in verschiedenen Zellkulturplatten.

Wells/ Platte	Zellzahl	DMEM mit 10 % (v/v) FCS	Transfektionsansatz
6 Wells	100.000	1200 µl	300 µl
24 Wells	30.000	400 µl	100 µl
96 Wells	10.000	80 µl	20 µl

2.2.8 Transfektion von Glioblastomzellen mit siRNA-Pools

Zur Herunterregulation der lncRNAs wurden die Glioblastomzellen mit einem siPOOL™ transfiziert. Dazu wurden die Zellen je nach weiterführendem Experiment 24 h vor Transfektion in 96, 24 oder 6 Well-Zellkulturplatten in DMEM mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin ausgesät (Zellzahl und Volumina siehe Tabelle 7). Die Zellen wurden mit je 2 nM des entsprechenden siPOOL™ gegen das jeweilige Zielgen transfiziert. Zusätzlich gab es eine Negativkontrolle (siNC). Hierbei handelte es sich um einen siPOOL welcher mit keinen Sequenzen im Transkriptom von Mensch, Maus und Ratte interagiert (Biotech).

Das Protokoll zur Transfektion von Gliomzellen mit siPOOL™ der Firma Biotech im 24 Well-Zellkulturplattenformat wurde mit Lipofectamine® RNAiMAX wie folgt durchgeführt:

Verdünnungsansatz A:

Transfektion	Lipofectamine® RNAiMAX	Opti-MEM™
1. 2 nM siPOOL™	1 µl	49 µl
2. 2 nM siNC	1 µl	49 µl
3. Lipofectamine Kontrolle	1 µl	49 µl

Verdünnungsansatz B:

Transfektion	siPOOL™ oder siNC	Opti-MEM™
1. 2 nM siPOOL™	0,1 µl	49,9 µl
2. 2 nM siNC	0,1 µl	49,9 µl
3. Lipofectamine Kontrolle	0,0 µl	50,0 µl

Der weitere Versuchsablauf erfolgte wie unter 2.2.7.2 beschrieben.

Als Variation wurden die Zellen mit Lipofectamine® 2000 anstatt Lipofectamine® RNAiMAX transfiziert.

2.2.9 Bromdesoxyuridin (BrdU) Proliferations-Assay

Mittels Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent) Assay der Firma Roche wurde die Proliferationsrate der Gliomzellen nach Transfektion mit einem siPOOL™ bestimmt. Dieses Assay enthält das Pyrimidinanalog BrdU, welches anstelle von Thymin in die DNA eingebaut wird. Mithilfe eines Antikörpers gegen BrdU kann anschließend aufgrund der Menge des eingebauten BrdUs auf die Proliferationsrate in einer gewissen Zeitspanne geschlossen werden. Die Bestimmung der Proliferationsrate erfolgte nach Angaben des Herstellers, wurde allerdings unter folgenden Bedingungen modifiziert:

Die Zellen wurden mit der BrdU *labeling solution* transfiziert und anschließend 120 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das FixDenat 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend erfolgte die Antikörperbehandlung für 90 min ebenfalls bei Raumtemperatur. Die Waschvorgänge wurden insgesamt 15 min (dreimal jeweils 5 min) auf einem Schüttler durchgeführt und die Proben wurden zum Schluss 10 min mit der Chemiluminescence Lösung inkubiert.

2.2.10 Zellvitalitäts-Assay

Mittels CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay der Firma Promega wurde die Vitalität der Gliomzellen nach Transfektion mit einem spezifischen siPOOL™ oder entsprechender Kontrolle bestimmt. Die Messung erfolgte nach Angaben des Herstellers nach 10 min Inkubationszeit.

2.2.11 Caspase-3/7-Assay

Mittels Caspase-Glo®-3/7-Assay der Firma Promega wurde die Apoptoserate der Gliomzellen nach Transfektion mit einem spezifischen siPOOL™ oder entsprechender Kontrolle bestimmt. Die Messung erfolgte nach Angaben des Herstellerst nach 90 min Inkubationszeit.

2.2.12 Durchflusszytometrie

Mittels Cell Event Caspase 3/7 Green Flow Cytometry Assay der Firma Invitrogen™ wurde eine durchflusszytometrische Messung der Gliomzellen nach Transfektion mit einem spezifischen siPOOL™ oder entsprechender Kontrolle durchgeführt. Für eine 24 Well-Platte wurden die mit siPOOL™-transfizierten Zellen wie folgt behandelt: Zunächst

wurde der Zellkulturüberstand jedes Wells in je ein dafür vorgesehenes FACS-Röhrchen pipettiert. Ziel der durchflusszytometrischen Messung war es, sämtliche Zellen und Zellfragmente eines jeweiligen Wells beurteilen zu können. Hierfür mussten alle Lösungen, die im Rahmen nachfolgender Schritte verwendet wurden, ebenfalls in das gleiche FACS-Röhrchen pipettiert werden. Nach dem Abnehmen des Zellkulturüberstands wurden die Zellen zunächst mit 200 µl DPBS gewaschen und die Waschlösung in das FACS-Röhrchen pipettiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit 200 µl Trypsin-EDTA vom Boden der Platte gelöst. Nach 5 min Inkubationszeit wurde das Trypsin mit 300 µl FCS versetztem DMEM wieder neutralisiert. Die 500 µl Lösung wurden ebenfalls in das FACS-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurden die Röhrchen bei 1300 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet wieder in 500 µl Vollmedium gelöst.

Nach Protokoll wurden die Zellen nun mit 0,5 µl des ersten Farbstoffs CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent versetzt. Die Röhrchen wurden lichtgeschützt für 25 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und nach 10 min bei Raumtemperatur mit dem zweiten Farbstoff SYTOX™ AADvanced™ Dead Cell Stain versetzt. Nach 5 min konnte die Messung am MoFlo™ XDP, Flow Cytometer Cell Sorter durchgeführt werden. Die Ergebnisse wurden anschließend mittels Summit Software 5.1.0 analysiert.

2.2.13 Zellzahlbestimmung

Für die Durchführung von Wachstumsanalysen mittels Zellzahlbestimmung wurden die Glioblastomzellen zunächst mit einem siPOOL™ oder entsprechender Kontrolle transfiziert. Die Aussaat erfolgte in 24 Well-Zellkulturplatten und die Zellzahl-Messungen erfolgten 24 h, 48 h und 72 h nach der Transfektion. Zur Vorbereitung der Messung wurde der Zellkulturüberstand abgesaugt, die Zellen mit DPBS gewaschen und anschließend mit 300 µl Trypsin versehen. Nach 5 min Inkubationszeit im Brutschrank wurde das Trypsin mit 700 µl DMEM mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum neutralisiert. Die 1 ml Lösung wurde in ViCell™ Tubes pipettiert und anschließend mittels Vi-CELL™-XR-Cell-Counter die Zellzahl gemessen.

2.2.14 Statistische Auswertungen

Drei unabhängige Versuche wurden in Balkendiagrammen präsentiert $\pm$ Standardabweichung. Die Signifikanztestung erfolgte im gepaarten oder ungepaarten t-Test. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant betrachtet. Für multiples Testen wurden die Signifikanzniveaus mittels Bonferroni korrigiert.

Mittels Datensatzes des TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) wurden die lncRNA Expressionsraten und ihre Assoziation zu dem Gesamtüberleben der Patienten untersucht (<http://cancergenome.nih.gov/>). Hierbei wurden die Expressionsdaten der lncRNAs mittels Open-Source-R-Paket ‚CGSDR‘ und der statistischen Programmiersprache R anhand der Datenportale GDC (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) und cBio Cancer Genomics (www.cbioportal.org) ermittelt. [240, 241] Zur Einteilung der Tumoren gemäß der WHO-Klassifikation wurden schon früher publizierte Informationen über den IDH-Status verwendet. [25]

Um den Zusammenhang der lncRNA-Expression und dem Überleben der Patienten zu untersuchen, wurden die TCGA-Kohorte in zwei Gruppen aufgeteilt. Hierbei handelte es sich um eine Gruppe mit hohen und eine mit niedrigen Expressionsraten der jeweiligen lncRNA. Dabei wurde der Median als *cut-off* Wert verwendet. Die Überlebensdaten wurden auf Grundlage einer früheren TCGA-Veröffentlichung verwendet. [242] Die Kaplan-Meier-Kurven wurden mittels R-Paket ‚Survival‘ erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Expressionsanalysen von *RAD51-AS1* und *RAD51* in Glioblastomzelllinien und Tumorgewebeproben aus primären und rezidierten Glioblastomen

3.1.1 Vorarbeiten zur Auswahl der lncRNA *RAD51-AS1*

Die lncRNA *RAD51-AS1* liegt Kopf-an-Kopf mit dem DNA-Reparaturgen *RAD51* (Abb. 3). Als Teil eines Multiproteinkomplexes ist *RAD51* an der homologen Rekombination zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen, beispielsweise ausgelöst durch eine TMZ-Therapie, beteiligt. [102, 231] In mehreren Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass die Expression von *RAD51* in IDH-Wildtyp Glioblastomen im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe stark erhöht ist. [232, 233, 243]

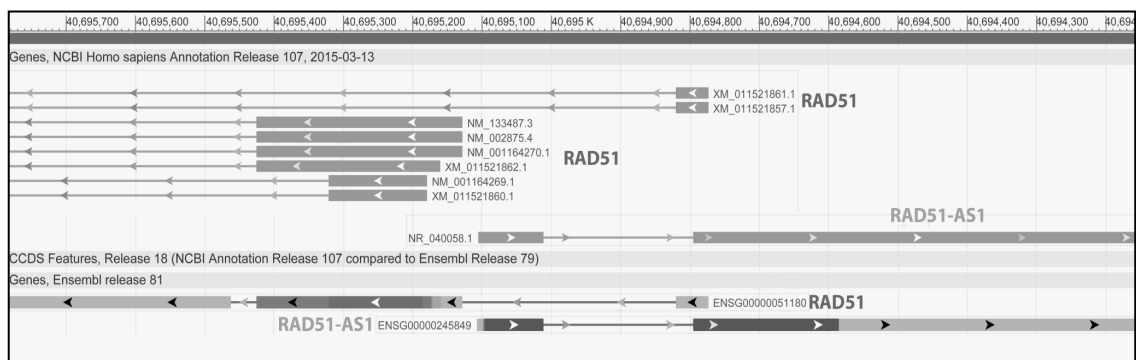


Abbildung 3: Genomische Lage von *RAD51-AS1* zu *RAD51* auf Chromosom 15q15.1. Anhand der Abbildung erkennt man die genomische Lage von *RAD51-AS1* und *RAD51*, welche Kopf-an-Kopf liegen und sich teilweise überschneiden. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5888?report=gene_table)

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Weller, Universitätsspital Zürich, wurden drei etablierte Glioblastomzelllinien, LNT229, LN308 und LN18, mit repetitiv steigenden TMZ-Konzentrationen behandelt, um einen stabilen resistenten Phänotyp zu generieren. [244] Die Zelllinien wurden anschließend auf die sich entwickelten Resistenzmechanismen untersucht. In den resistenten LN18 Zellen ließ sich eine konstitutive *MGMT*-Expression feststellen. [244] Diese *MGMT*-Expression steht, wie zuvor beschrieben, im starken Zusammenhang mit der Resistenz gegenüber TMZ. [105, 106] In den resistenten LNT229 Zellen konnte nach der TMZ-Behandlung eine Herunterregulation von diversen *Mismatch-repair*-Proteinen, beispielsweise von *MSH6*,

detektiert werden. In der Zelllinie LN308 konnte kein bestimmter Resistenzmechanismus nachgewiesen werden. [244]

Da Resistenzentwicklungen multimodal entstehen und mehr als einen Signalweg involvieren können, wurden für weitergehende Experimente Mikroarray-Expressionsanalysen der parentalen und TMZ-resistenten Zelllinien mittels Hybridisierung der Gesamt-RNA auf Gene Chip® Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays (Thermo F. Scientific Corp., Waltham, MA) durchgeführt. Diese Arrays ermöglichen nicht nur den Nachweis proteinkodierender mRNA, sondern erlauben gleichzeitig die Expressionsanalyse langer nicht-kodierender RNA-Transkripte. Die bioinformatische Auswertung der Expression in Bezug auf differentiell exprimierte lange nicht-kodierende RNAs wurde von Daniel Picard (Universitätsklinikum Düsseldorf, Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie) durchgeführt. [235] Die Ergebnisse wurden freundlicherweise von Daniel Picard zur Verfügung gestellt und sind in Abb. 4 zu sehen. Anhand dieser Mikroarrayanalysen konnte eine erhöhte Expression der lncRNA *RAD51-AS1* in den parentalen im Vergleich zu den TMZ-resistenten LN18, LN308 und LNT229 Zellen gezeigt werden.

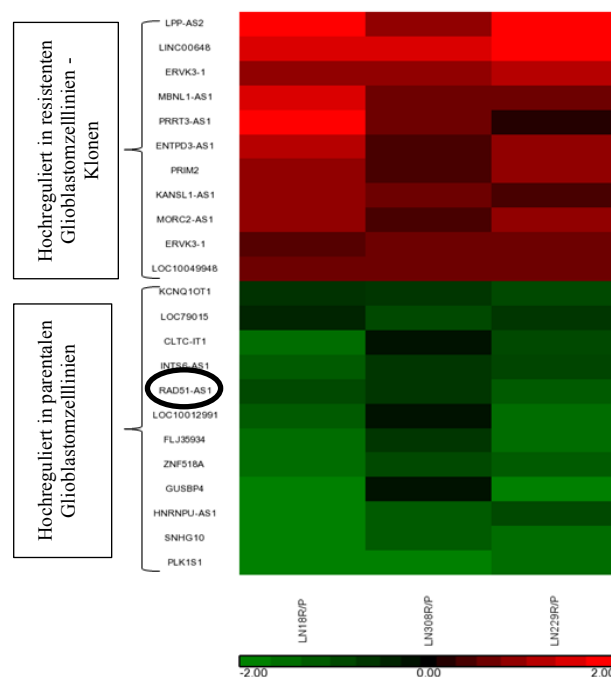


Abbildung 4: Ergebnisse der Mikroarray-Expressionsanalysen verschiedener lncRNAs in den parentalen und TMZ-resistenten LN18, LN308 und LNT229 Glioblastomzelllinien. Gezeigt werden die 23 lncRNAs mit den stärksten Expressionsunterschieden zwischen den parentalen und den TMZ-resistenten Zellen. Im oberen Block sind die lncRNAs zu sehen, die in den TMZ-resistenten Zelllinien höher exprimiert waren (rot). Im unteren Block kann man die lncRNAs erkennen, die in den parentalen Zelllinien höher exprimiert waren (grün). Schwarz umrandet, lncRNA *RAD51-AS1*.

Aufgrund der spezifischen Kopf-an-Kopf Lage von *RAD51-AS1* und *RAD51*, sowie der erhöhten Expression von *RAD51-AS1* in den parentalen Glioblastomzelllinien stellte sich die Frage nach einer möglichen Wechselwirkung zwischen den beiden Genen *RAD51-AS1* und *RAD51*. Hierzu wurde zunächst die differentielle Expression von *RAD51-AS1* in den für die Mikroarray-Expressionsanalysen verwendeten parentalen und TMZ-resistenten Zelllinien LNT229, LN308 und LN18 (nachfolgend als Screening-Proben bezeichnet) mittels Echtzeit-RT-PCR validiert und ebenfalls die Expression von *RAD51* in diesen Proben bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression beider Gene in anderen Passagen der parentalen und TMZ-resistenten Zelllinien von LNT229 und LN18 (nachfolgend als Validierungsproben bezeichnet) untersucht.

3.1.2 Expressionsanalysen von *RAD51-AS1* und *RAD51* in parentalen und TMZ-resistenten Zelllinien

Die Expressionsanalysen der lncRNA *RAD51-AS1* und *RAD51* in den Screening-Proben der parentalen und TMZ-resistenten Zelllinien LNT229, LN308 und LN18, sowie den Validierungsproben LNT229 und LN18 (parental und TMZ-resistent) wurden mittels Echtzeit-RT-PCR durchgeführt und anschließend mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet. Hierbei diente *Human universal reference* RNA als Kalibrator, die Expression von *ARF1* wurde als Referenz verwendet (Abb. 5).

Bei den Expressionsanalysen der lncRNA *RAD51-AS1* ließ sich eine mit Mittel deutlich erhöhte Expression in den parentalen LN18 Zellen (Screening-Probe) im Vergleich zur Expression in den resistenten Zellen feststellen (Abb. 5A), die aber aufgrund der starken Abweichung der drei Messwerte nicht signifikant war (Mittelwert *RAD51-AS1* in parental LN18: 10,29; SD (Standardabweichung): 8,712; Mittelwert *RAD51-AS1* in resistenten LN18: 2,74; SD: 0,715). Bei den Validierungsproben von LNT299 und LN18 zeigte sich eine Tendenz ohne Signifikanz zur erhöhten Expression von *RAD51-AS1* in den resistenten Zellen (Abb. 5B).

Die Expressionsanalysen von *RAD51* wurden in denselben Zelllinien-Proben wie für *RAD51-AS1* durchgeführt. In den LN18 Zellen (Validierungsproben) konnte hierbei eine signifikant erhöhte Expression ($p=0,0404$) in den resistenten Zellen (Mittelwert *RAD51*: 1,12; SD: 0,1) im Vergleich zur Expression in den parental Zellen (Mittelwert *RAD51* LN18: 0,8; SD: 0,11) nachgewiesen werden (Abb. 5D), während in allen weiteren

untersuchten Zelllinien kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen parentalen und resistenten Zellen nachweisbar war.

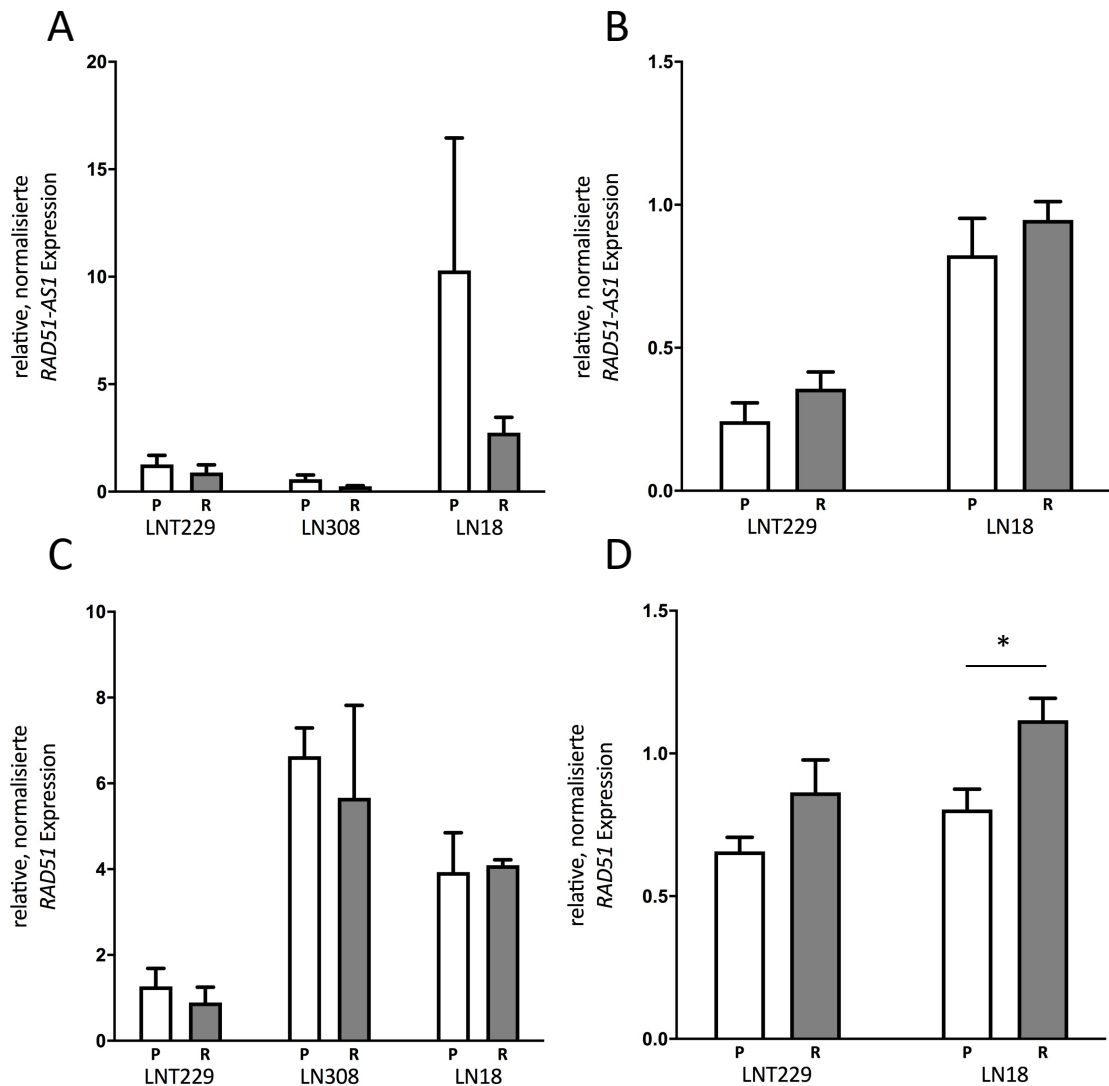


Abbildung 5: Ergebnisse der Echtzeit-RT-PCR-basierten Expressionsanalysen von *RAD51-AS1* (A, B) und *RAD51* (C, D) in parentalen und resistenten LNT229, LN308 und LN18 Zellen. Die PCR wurde mittels $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet. *Human universal reference* RNA diente als Kalibrator. *ARF1* wurde als Referenzgen verwendet. A/C: Screening-Proben der drei parentalen und TMZ-resistenten Zelllinien. B/D: Validierungsproben aus einer anderen Passage der entsprechenden Zelllinien. Die Balken repräsentierten den Mittelwert, die Fehlerbalken die Standardabweichung, $n=3$. Die Signifikanztestung erfolgte im ungepaarten t-Test. Signifikante Expressionsunterschiede: *, $p < 0,05$.

3.1.3 Expressionsanalysen von *p21*, *MSH6* und *MGMT* in parentalen und TMZ-resistenten Zelllinien

Im Rahmen der Expressionsanalysen (siehe 3.1.2) konnte in den Screening-Proben eine differentielle Expression von *RAD51-AS1* nicht validiert werden. Daher sollte nachfolgend untersucht werden, ob die differentielle Expression einiger anderer, von Happold und Koautoren beschriebener [244], proteinkodierender Gene in den Screening-Proben nachgewiesen werden können. Hierfür wurden zusätzliche Expressionsanalysen von *p21*, *MSH6* und *MGMT* in den Screening-Proben durchgeführt. Die Expressionsanalysen in den Glioblastomzelllinien wurden in drei unabhängigen Versuchen mittels Echtzeit-RT-PCR durchgeführt und anschließend mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet. Hierbei diente *Human universal reference* RNA als Kalibrator, die Expression von *ARF1* wurde als Referenz verwendet (Abb. 6).

In den LNT229 Zellen (Validierungsproben) konnte eine signifikant erhöhte Expression ($p=0,0066$) von *p21* in den parentalen Zellen (Mittelwert *p21*: 1,39; SD: 0,1) im Vergleich zur Expression in den resistenten Zellen (Mittelwert *p21*: 0,79; SD: 0,12) nachgewiesen werden (Abb. 6B). In den LN18 Zellen (Validierungsproben) hingegen ließ sich eine signifikant erhöhte ($p=0,0021$) Expression von *p21* in den resistenten Zellen (Mittelwert *p21*: 2,59; SD: 0,11) im Vergleich zu den parentalen Zellen (Mittelwert *p21*: 0,76; SD: 0,35) nachweisen (Abb. 6B).

Bei den Expressionsanalysen von *MSH6* ließ sich eine mit Mittel deutlich erhöhte Expression in den parentalen LN18 Zellen (Screening-Probe) im Vergleich zur Expression in den resistenten Zellen feststellen (Abb. 6C), die aber aufgrund der starken Abweichung der drei Messwerte nicht signifikant war (Mittelwert *MSH6* in parentalen LN18: 5,85; SD: 3,57; Mittelwert *MSH6* in resistenten LN18: 2,44; SD: 0,59).

Die Expressionsanalysen von *MGMT* zeigten sowohl in den Screening-, als auch in den Validierungsproben eine erhöhte Expression in den resistenten LN18 Zellen (Abb. 6E/F). In den Screening-Proben konnte aufgrund der starken Abweichung der drei Messwerte keine Signifikanz ($p=0,0751$) nachgewiesen werden (Mittelwert *MGMT* in parentalen LN18: 3,89; SD: 0,87; Mittelwert *MGMT* in resistenten LN18: 11,22; SD: 3,51) (Abb. 6E). In den Validierungsproben hingegen konnte eine signifikant erhöhte ($p<0,0001$) Expression von *MGMT* in den resistenten LN18 Zellen (Mittelwert *MGMT*: 4,99; SD: 0,34) im Vergleich zu den parentalen Zellen (Mittelwert *MGMT*: 0,82; SD: 0,11) nachgewiesen werden (Abb. 6F).

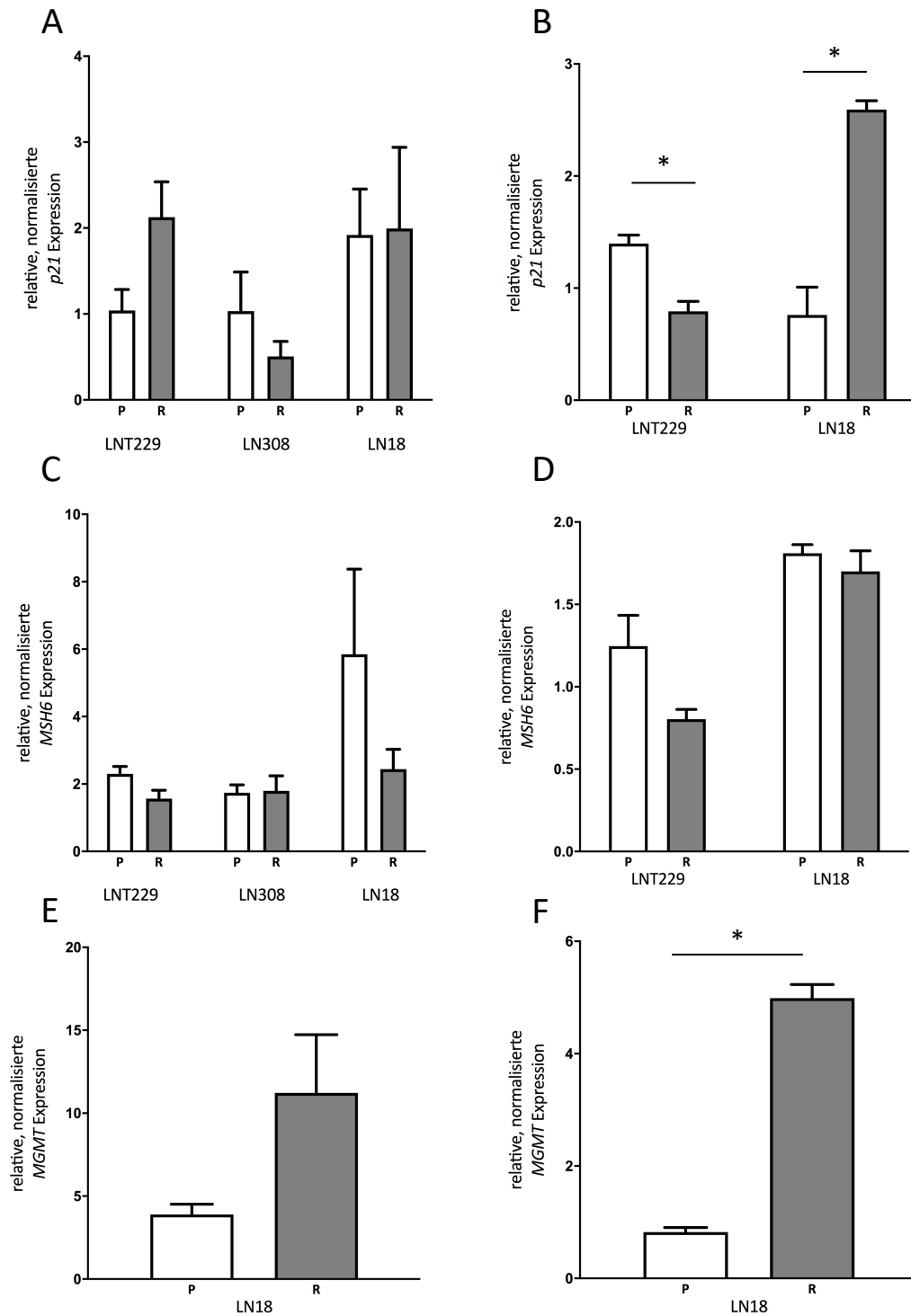


Abbildung 6: Ergebnisse der Echtzeit-RT-PCR-basierten Expressionsanalysen von *p21* (A, B), *MSH6* (C, D) und *MGMT* (E, F) in parental und TMZ-resistenten LNT229, LN308, LN18 Glioblastomzelllinien. Die PCR wurde mittels $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet. *Human universal reference* RNA diente als Kalibrator. *ARF1* wurde als Referenzgen verwendet. A/C/E: Screening-Proben der drei parental und TMZ-resistenten Zelllinien. B/D/F: Validierungsproben aus einer anderen Passage der entsprechenden Zelllinien. Die Balken repräsentierten den Mittelwert, die Fehlerbalken die Standardabweichung, n=3. Die Signifikanztestung erfolgte im ungepaarten t-Test. Signifikante Expressionsunterschiede: *, $p < 0,05$.

Aufgrund der Voruntersuchungen von Happold und Koautoren waren bestimmte Veränderungen der drei proteinkodierenden Gene (*p21*, *MSH6* und *MGMT*) in den Screening-Proben zu erwarten [244].

Zum einen wurde in den Voruntersuchungen eine signifikant erhöhte Expression ($p < 0.001$) von *p21* in den resistenten LN18 Zellen gezeigt. In den resistenten LNT229 und LN308 Zellen wurde hingegen keine differentielle Expression nachgewiesen [244]. Happold und Koautoren zeigten zudem eine signifikant verminderte ($p < 0,01$) *MSH6*-Expression in den resistenten LNT229 Zellen, während in den resistenten LN308 und LN18 Zellen keine Veränderung nachgewiesen wurde [244]. Zusätzlich wurde bei der *MGMT*-Expression in den Voruntersuchungen eine signifikant erhöhte ($p < 0,05$) Expression in den resistenten, im Vergleich zu den parental LN18 Zellen, nachgewiesen [244].

3.1.4 Expressionsanalysen von *RAD51-AS1* und *RAD51* in Primär- und Rezidivtumorproben von Glioblastompatienten

Zusätzlich zu den Expressionsanalysen in parental und resistenten Zelllinien (Vergleich 3.1.2) wurden weitere Expressionsanalysen von *RAD51-AS1* und *RAD51* in Primär- und Rezidivtumorproben von Glioblastomen durchgeführt. Diese Proben stammten aus der ZNS-Tumorgewebekbank Düsseldorf (CNS-TuBa). Für diese Arbeit wurde Tumorgewebe von sechs Patienten getestet. Hierbei handelte es sich jeweils um Proben des Primärtumors und Rezidivs nach Radiotherapie und TMZ-Behandlung.

Die Expressionsanalysen in den Tumorproben wurden mittels Echtzeit-RT-PCR durchgeführt und anschließend mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet. Hierbei diente *Human universal reference* RNA als Kalibrator, die Expression von *ARF1* wurde als Referenz verwendet (Abb. 7).

Im Rahmen der Expressionsanalysen der lncRNA *RAD51-AS1* konnten bei den Patienten 2, 3 und 6 eine höhere Expression in den Proben des Primärtumors, im Vergleich zu den Proben des Rezidivs gezeigt werden (Werte *RAD51-AS1*-Expression: [Patient 2] Primärtumor: 1,67, Rezidivtumor: 0,99; [Patient 3] Primärtumor: 0,68, Rezidivtumor: 0,55; [Patient 6] Primärtumor: 2,60, Rezidivtumor: 0,40).

Bei Patient 1 und 5 zeigte sich eine annähernd gleich hohe Expression von *RAD51-AS1* in den Proben des Primär- und Rezidivtumors (Werte *RAD51-AS1*-Expression: [Patient 1] Primärtumor: 0,61, Rezidivtumor: 0,58; [Patient 5] Primärtumor: 0,51, Rezidivtumor:

0,49). Lediglich bei Patient 4 konnte eine erhöhte Expression von *RAD51-AS1* im Rezidivtumorgewebe, im Vergleich zum Primärtumor festgestellt werden (Werte *RAD51-AS1*-Expression: [Patient 4] Primärtumor: 0,85, Rezidivtumor: 1,01).

Anhand der Expressionsanalysen des DNA-Reparaturgens *RAD51* konnte bei den Patienten 1, 2, 3 und 4 eine erhöhte Expression von *RAD51* in den Rezidivtumorproben gezeigt werden (Werte *RAD51*-Expression: [Patient 1] Primärtumor: 0,27, Rezidivtumor: 2,73; [Patient 2] Primärtumor: 1,07, Rezidivtumor: 2,02; [Patient 3] Primärtumor: 0,57, Rezidivtumor: 2,23; [Patient 4] Primärtumor: 0,25, Rezidivtumor: 1,03). Dahingegen konnte bei Patient 5 und Patient 6 eine erhöhte *RAD51*-Expression in den Primärtumorproben nachgewiesen werden (Werte *RAD51*-Expression: [Patient 5] Primärtumor: 6,51, Rezidivtumor: 2,5; [Patient 6] Primärtumor: 1,74, Rezidivtumor: 1,09).

Zusammengefasst war nur bei Patient 2 eine eindeutig erhöhte Expression von *RAD51-AS1* in der Primärtumorprobe und zusätzlich eine eindeutig erhöhte Expression von *RAD51* in der Rezidivtumorprobe festzustellen.

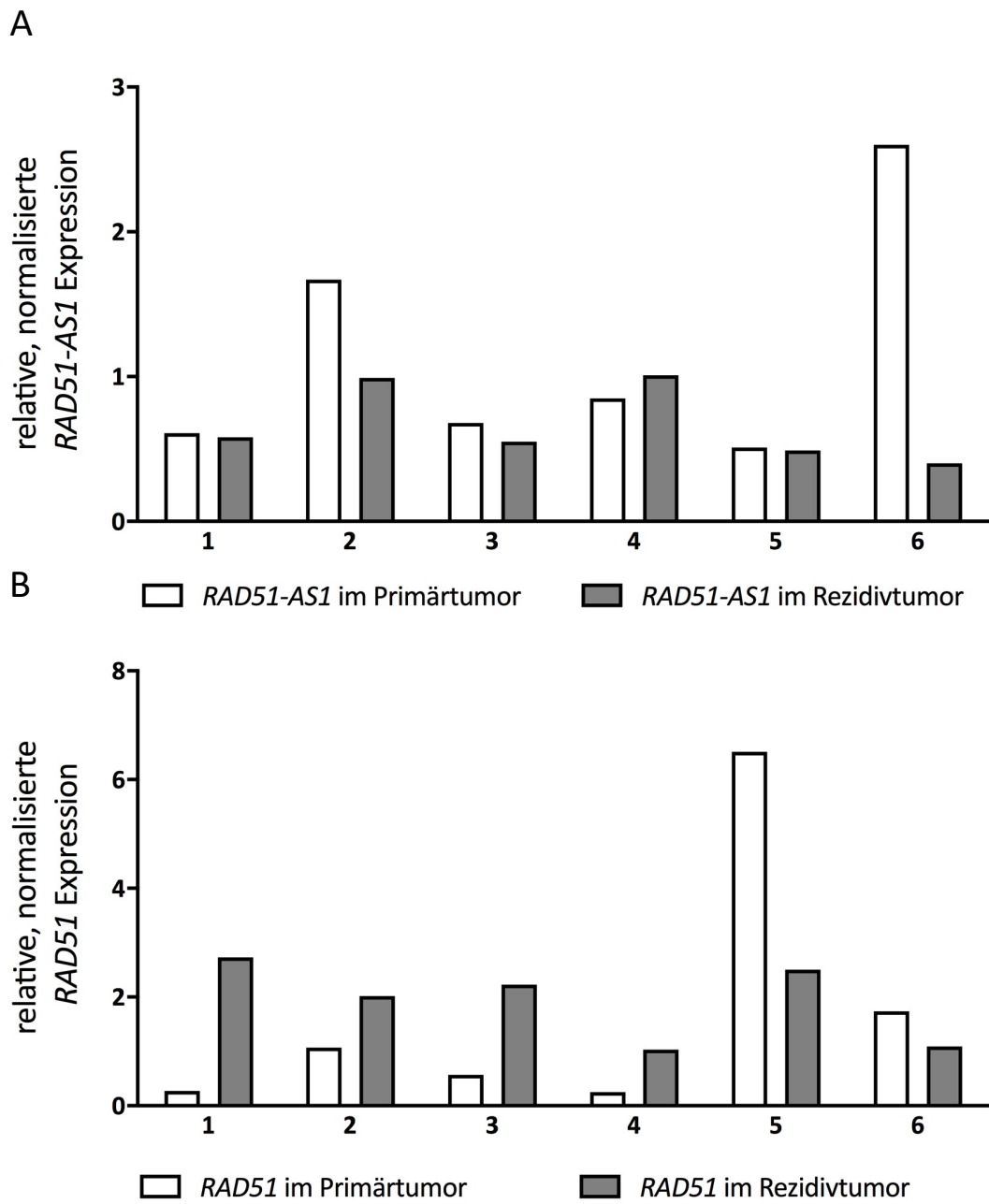


Abbildung 7: Ergebnisse der Echtzeit-RT-PCR-basierten Expressionsanalysen von *RAD51-AS1* (A) und *RAD51* (B) in Primär- und Rezidivtumorproben von sechs Glioblastompatienten (1-6). Die PCR wurde mittels $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet. *Human universal reference* RNA diente als Kalibrator. *ARF1* wurde als Referenzgen verwendet.

3.2 Optimierung des Knockdowns von *RAD51-AS1* in Gliomzellen

Für den zweiten Teil dieser Arbeit, sollte ein effektiver Knockdown der lncRNA *RAD51-AS1* mittels siRNAs etabliert werden. Für die Optimierung des Knockdowns wurden einzelne siRNAs und siRNA-Pools verwendet. Insgesamt wurden zwei verschiedene Kits für einzelne siRNAs getestet und ein Kit für siRNA-Pools. Im Rahmen der Optimierung des siRNA-gesteuerten Knockdowns sollten Effizienzunterschiede zwischen der Transfektion von einzelnen siRNAs und siRNA-Pools untersucht werden.

3.2.1 Herunterregulation von *RAD51-AS1* mittels einzelner siRNAs

3.2.1.1 *FlexiTube GeneSolution siRNA, Qiagen*

Zur Herunterregulation der Expression der lncRNA *RAD51-AS1* wurden U251MG Glioblastomzellen mit einzelnen siRNAs transfiziert. Diese einzelnen (single) siRNAs bestanden aus vier einzelnen, je 21 Basenpaare langen siRNA Molekülen (single siRNA 1-4), die jeweils an unterschiedlichen Sequenzen der Ziel-RNA binden. Durch die Verwendung mehrerer siRNAs wird die Wahrscheinlichkeit minimiert, dass es zu fehlerhaften Interpretationen der Ergebnisse durch sogenannte *off-target*-Effekte kommt. Solche *off-target*-Effekte können durch fehlerhafte Bindung der siRNA an nicht Ziel-Sequenzen entstehen, welche die Ergebnisse der Versuche verfälschen könnten (siehe 4.2.1). Laut Herstellerangaben ist die Wahrscheinlichkeit derselben *off-target*-Effekte bei zwei unterschiedlichen siRNAs sehr gering und somit kann durch Verwendung der vier siRNAs eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse nach dem Knockdown der lncRNA entdeckt und verifiziert werden.

Als weitere Kontrolle zur Bestimmung von Nebeneffekten der siRNA-Transfektion diente die *Negative Control* siRNA FlexiTube siRNA (single siRNA NC/NC), welche in diesem Falle laut Herstellerangaben eine nicht zielgerichtete siRNA ist, die mit keiner Sequenz im Transkriptom von Säugerzellen interagiert.

Folgende Parameter wurden variiert: 1. Konzentration der siRNA 10 nM oder 30 nM, 2. Extraktion der RNA 24 h oder 48 h nach Transfektion. Der Knockdown mit der höchsten Effizienz wurde mit folgendem Protokoll erzielt: Die U251MG Zellen wurden in einer Dichte von 100.000 Zellen/Well in 24 Well-Zellkulturschalen in 500 µl DMEM mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin ausgesät. 24 h nach Aussaat wurden die Zellen mit 10 nM je single siRNA-*RAD51-AS1* oder 10 nM single

siRNA-NC nach Protokoll (siehe 2.2.7.1) transfiziert. Die RNA wurde 48 h nach Transfektion mittels TRIzol™ extrahiert und in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.2). Die Expressionsanalysen der lncRNA *RAD51-AS1* erfolgte mittels Echtzeit-RT-PCR und wurde anschließend mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet. Hierbei diente *Human universal reference* RNA als Kalibrator, die Expression von *ARF1* wurde als Referenz verwendet (Abb. 8).

Mit keiner der vier verwendeten einzelnen siRNAs konnte eine mehr als 50 %ige Herunterregulation der *RAD51-AS1* Expression erzielt werden. Die einzelne (single) siRNA 4 zeigte in diesem Versuchsaufbau den stärksten Effekt (*RAD51-AS1*-Expression in U251MG: single siRNA 1: 0,82; single siRNA 2: 0,74; single siRNA 3: 1,02; single siRNA 4: 0,64).

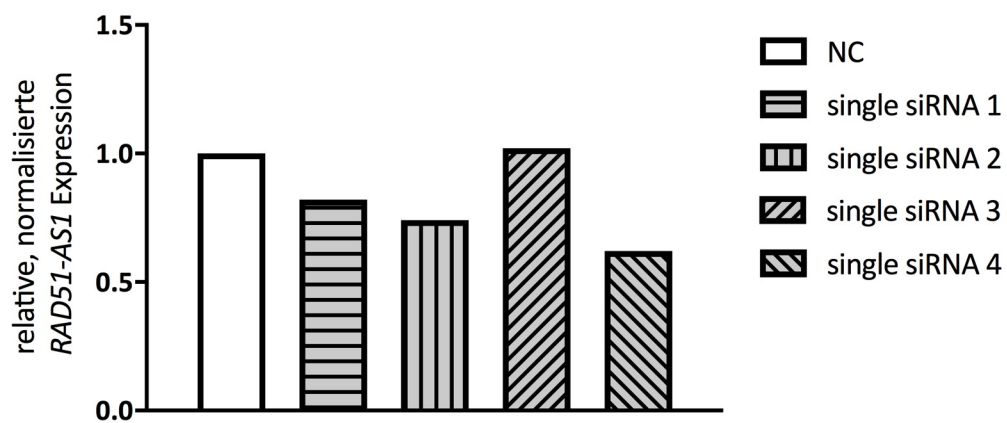


Abbildung 8: Ergebnisse der Echtzeit-RT-PCR-basierten Expressionsanalysen von *RAD51-AS1* nach dem *in vitro* Knockdown mittels Transfektion von einzelnen siRNAs gegen *RAD51-AS1* (Qiagen). 24 h nach Aussaat von 100.000 Zellen/Well in einer 24 Well-Platte wurden U251MG-Zellen mit 10 nM je einzelner siRNA transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde RNA extrahiert. Die PCR wurde mittels $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet. Als Referenzgen diente *ARF1*. Dieser Versuch wurde einmal durchgeführt mit je 2 Replikaten pro siRNA. Die Negativkontrolle wurde gleich 1 gesetzt.

3.2.1.2 TriFECTa™ Dicer-Substrate RNAi Kit, IDT

Zur Herunterregulation der lncRNA *RAD51-AS1* wurden U251MG und T98G Glioblastomzellen mit einzelnen siRNAs transfiziert (siehe 2.2.7.2). Diese siRNAs bestanden aus 3 einzelnen, je 27 Basenpaare langen siRNA-Molekülen (single siRNA 1-3). Die siRNAs sind gegen verschiedene Zielsequenzen der lncRNA gerichtet, wodurch mögliche Einflüsse durch *off-target*-Effekte detektiert werden können (siehe 3.2.1.1). Als Kontrolle zur Bestimmung von Nebeneffekten der siRNA-Transfektion diente die *Negative Control* DsiRNA (single siRNA-NC/NC), welche in diesem Falle laut Herstellerangaben eine nicht zielgerichtete DsiRNA ist, die mit keinen Sequenzen in den Transkriptomen von Mensch, Maus oder Ratte interagiert. Zudem gab es eine *HPRT-S1* DS Positivkontrolle (*HPRT* PC) und die Möglichkeit die Transfektion mittels Fluoreszenzmarkierung, d.h. mittels TYE 563 DS *Transfection control* Lösung, sichtbar zu machen. Für die *HPRT-S1* DS Positivkontrolle garantiert der Hersteller einen Knockdown der RNA von über 90 % nach 24 h (bei Verwendung von 10nM *HPRT-S1* DS Positivkontrolle). Neben der Expressionsrate von *RAD51-AS1* wurde somit auch die Expressionsrate von *HPRT*, nach Knockdown mit der *HPRT-S1* Positivkontrolle, bestimmt. Weiterhin wurde die Transfektionseffizienz anhand der TYE 563 DS *Transfection* Kontrolle mittels Fluoreszenz Mikroskop bestimmt (Abb. 10). Für die Optimierung des Transfektionsprotokolls siehe 3.2.1.1. Nach Transfektion mit den jeweiligen siRNAs und den entsprechenden Positiv- und Negativkontrollen konnten die Expressionsanalysen der lncRNA *RAD51-AS1* und *HPRT* mittels Echtzeit-RT-PCR in den transfizierten U251MG und T98G Zellen bestimmt werden (Abb. 9).

Im Rahmen der Expressionsanalysen der lncRNA *RAD51-AS1* konnte sowohl in U251MG (*RAD51-AS1*-Expression in U251MG: single siRNA 1: 0,31; single siRNA 2: 0,54; single siRNA 3: 0,76) als auch in T98G Zellen (*RAD51-AS1*-Expression in T98G: single siRNA 1: 0,44; single siRNA 2: 0,88; single siRNA 3: 1,1) die single siRNA 1 den effektivsten Knockdown generieren (Abb. 9A/B). Beim Vergleich des Knockdowns in U251MG und T98G Zellen konnte zudem bei allen drei einzelnen siRNAs ein stärkerer Effekt in den U251MG Zellen beobachtet werden (Abb. 9A/B). Weiterhin wurde die Effektivität der Transfektion und des Knockdowns durch eine Expressionsanalyse der *HPRT* mRNA nach Transfektion mit der *HPRT-S1* Positivkontrolle beurteilt. Hierzu wurden die U251MG und T98G Zellen im gleichen Versuchsaufbau mit der Negativkontrolle, den einzelnen siRNAs 1-3 gegen *RAD51-AS1* und der *HPRT-S1*

Positivkontrolle transfiziert und anschließend die Expression von *HPRT* in allen Proben bestimmt. Die Negativkontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Diese Analysen zeigten eine stark verminderte Expression der *HPRT* mRNA in den U251MG Zellen (*HPRT*-Expression in U251MG: *HPRT*: 0,14) (Abb. 9C). In den T98G Zellen war die Herunterregulation der *HPRT* mRNA weniger stark ausgeprägt (*HPRT*-Expression in T98G: *HPRT*: 0,55) (Abb. 9D).

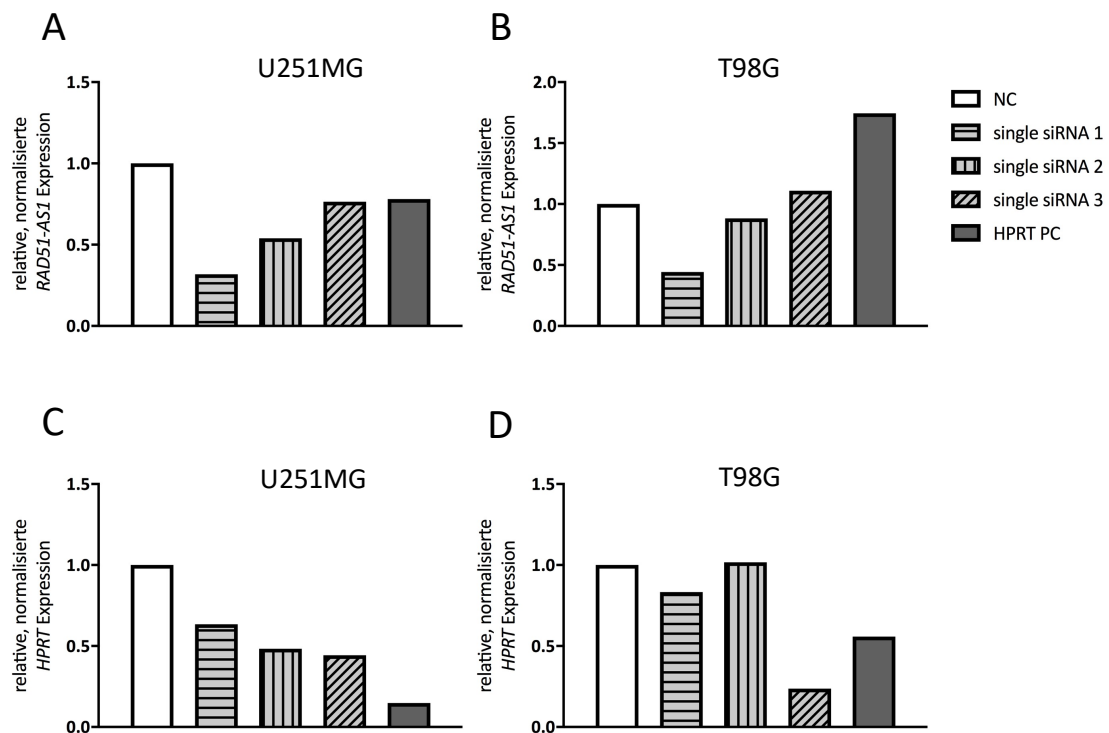


Abbildung 9: Ergebnisse der Echtzeit-RT-PCR-basierten Expressionsanalysen von *RAD51-AS1* nach dem *in vitro* Knockdown mit einzelnen siRNAs (Trifecta). 24 h nach Aussaat von 100.000 Zellen/Well in 24 Well-Platten wurden U251MG (A/C) und T98G (B/D) Glioblastomzelllinien mit 2 nM je einzelnen siRNAs transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde RNA extrahiert. Die PCR wurde mittels $2^{-\Delta\Delta CT}$ - Methode ausgewertet. Als Referenzgen diente *ARF1*. Dieser Versuch wurde einmal durchgeführt mit je 2 Replikaten pro siRNA. Die Negativkontrolle wurde gleich 1 gesetzt. A/B: *RAD51-AS1* Expressionsanalysen nach Knockdown der lncRNA *RAD51-AS1* mittels einzelner siRNA 1-3. C/D: *HPRT* Expressionsanalysen nach Knockdown von *HPRT* mittels *HPRT-SI* Positivkontrolle.

Anhand von TYE 563 fluoreszenzmarkierten siRNA-Duplex (DsiRNA) Molekülen wurde eine mikroskopische Beurteilung der Transfektion durchgeführt. Hierzu wurden 24 h nach der Transfektion der U251MG und T98G Zellen mit der TYE 563 fluoreszenzmarkierten DsiRNA mikroskopische Aufnahmen angefertigt. Hierbei zeigte sich eine deutliche Anreicherung der TYE 563 markierten DsiRNA im Zytoplasma der Gliomzellen. Diese Anreicherung sprach somit für eine erfolgreiche Transfektion der siRNA (Abb. 10).

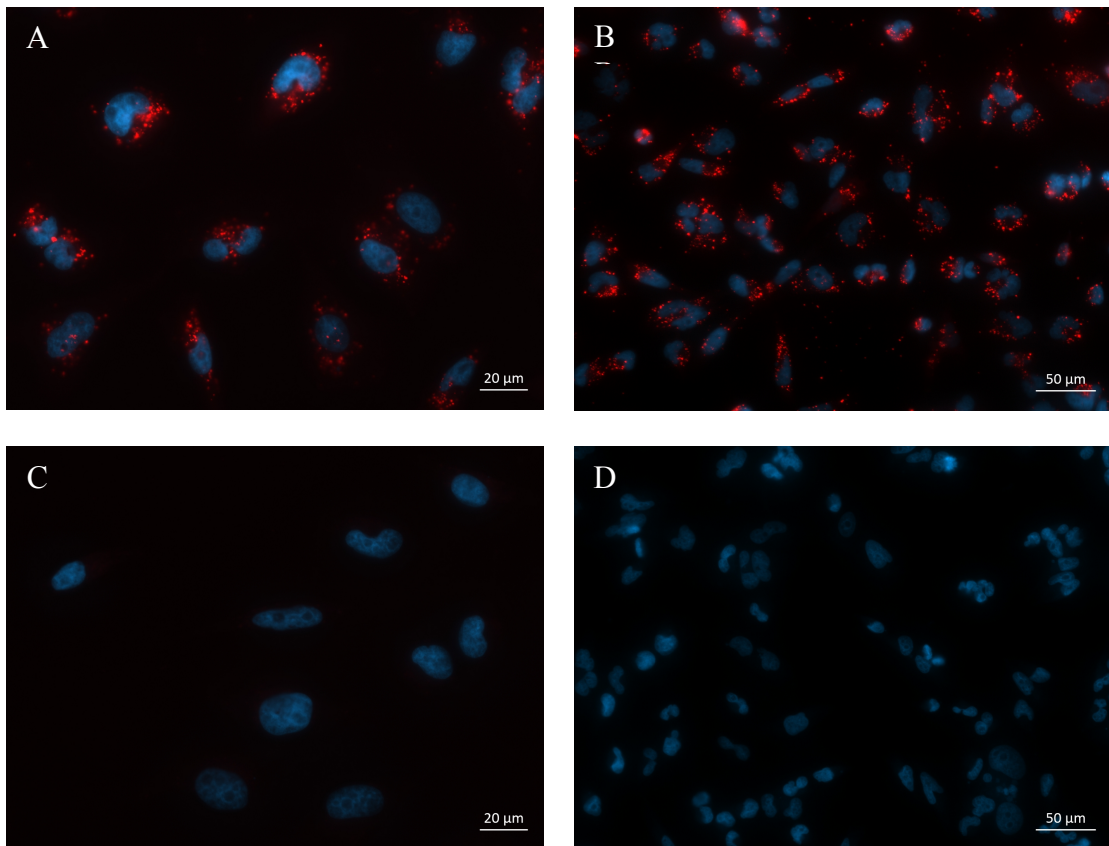


Abbildung 10: Transfektionseffizienz in den Glioblastomzelllinien U251MG (A/C) und T98G (B/D) visualisiert nach Transfektion mit TYE 563 markierten DsiRNA-Molekülen. 24 h nach Aussaat von 100.000 Zellen/Well in einer 24 Well-Platte wurden U251MG und T98G Zellen mit 1 nM TYE 563 markierten DsiRNA transfiziert (A/B). 24 h nach Transfektion wurde die Transfektionseffizienz mittels Fluoreszenzmikroskop bestimmt. C/D: Vergleichskontrollen, transfiziert mit der *Negative Control* DsiRNA (ohne TYE 563).

3.2.2 Herunterregulation von *RAD51-AS1* mittels siRNA-Pools

Zur Herunterregulation der lncRNA *RAD51-AS1* wurden U251MG und T98G Zellen mit einem siPOOL™ transfiziert. Der siPOOL™ besteht aus 30 einzelnen, gegen verschiedene Sequenzbereiche der lncRNA gerichteten, siRNA-Molekülen. Als Kontrolle zur Bestimmung von Nebeneffekten der siRNA-Transfektion diente die *Negative control* siPOOL (siPOOL NC), welche ebenfalls aus 30 verschiedenen siRNAs besteht, die laut Herstellerangaben mit keinen Sequenzen in den Transkriptomen von Mensch, Maus oder Ratte interagiert.

Folgende Parameter wurden variiert: 1. Zellzahl 10.000, 30.000, 100.000 Zellen/24 Well-Zellkulturschale; 2. Zeitpunkt der RNA-Extraktion 24 h, 48 h, 72 h nach Transfektion; 3. Transfektionsprotokoll mit Nutzung von Lipofectamine® 2000 oder Lipofectamine® RNAiMAX (siehe Abb. 12). Der effizienteste Knockdown wurde mit folgendem Protokoll erzielt: Die U251MG und T98G Zellen wurden in einer Dichte von 30.000 Zellen/Well in 24 Well-Zellkulturschalen in 500 µl DMEM mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin ausgesät. 24 h nach Aussaat wurden die Zellen mit je 2 nM siPOOL gegen die lncRNA *RAD51-AS1* (siPOOL *RAD51-AS1*) bzw. 2 nM *Negative control* siPOOL (siPOOL NC) nach Protokoll (siehe 2.2.8) transfiziert. Die RNA wurde 48 h nach Transfektion mittels TRIzol™ extrahiert und in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.2). Die Expressionsanalysen der lncRNA *RAD51-AS1* erfolgte mittels Echtzeit-RT-PCR und wurde anschließend mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet. Hierbei diente *Human universal reference* RNA als Kalibrator, die Expression von *ARF1* wurde als Referenz verwendet (Abb. 11).

In den U251MG Zellen wurde 48 h nach der Transfektion mit dem siPOOL gegen die lncRNA *RAD51-AS1* eine um 56 % verminderte Expression der lncRNA im Vergleich zur Expression in den kontrolltransfizierten Zellen nachgewiesen. In den T98G Zellen konnte eine um 40 % verminderte Expression der lncRNA *RAD51-AS1* im Vergleich zur Expression in den kontrolltransfizierten Zellen erzielt werden (Abb. 11).

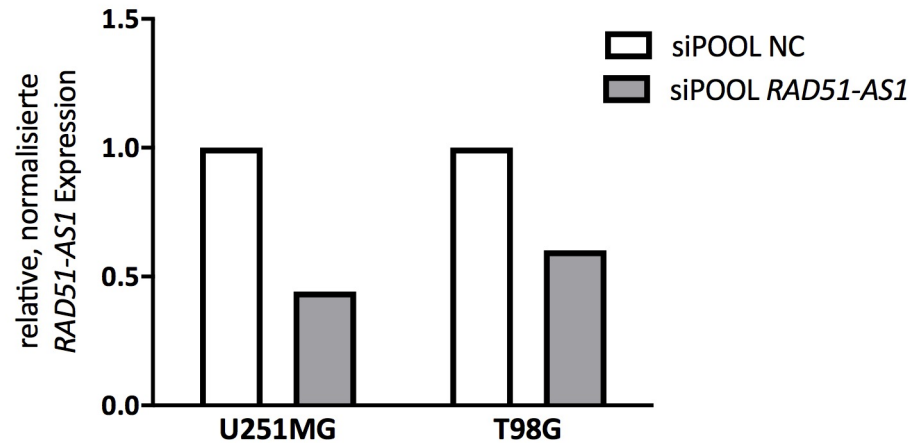


Abbildung 11: Ergebnisse der Echtzeit-RT-PCR-basierten Expressionsanalysen von *RAD51-AS1* nach *in vitro* Knockdown mittels siPOOL™ gegen die lncRNA *RAD51-AS1*. 24 h nach Aussaat von 30.000 Zellen/Well in einer 24 Well-Platte wurden U251MG und T98G Zellen mit 2 nM je siPOOL™ gegen die lncRNA *RAD51-AS1* transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde RNA extrahiert. Die PCR wurde mittels $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet. Als Referenzgen diente *ARF1*. Dieser Versuch wurde einmal durchgeführt mit je 2 Replikaten pro siRNA. Die Negativkontrolle wurde gleich 1 gesetzt.

Für den Vergleich der zwei Transfektionsreagenzien Lipofectamine® 2000 und Lipofectamine® RNAiMAX wurden T98G Zellen verwendet. Hierzu wurden die Zellen laut Transfektionsprotokoll mit 2 nM siPOOL gegen die lncRNA *RAD51-AS1* (siPOOL *RAD51-AS1*) bzw. 2 nM *Negative control* siPOOL (siPOOL NC) nach Protokoll (siehe 2.2.8) transfiziert. Hierfür wurde einmal das Transfektionsreagenz Lipofectamine® RNAiMAX und einmal Lipofectamine® 2000 verwendet (siehe Abb. 12).

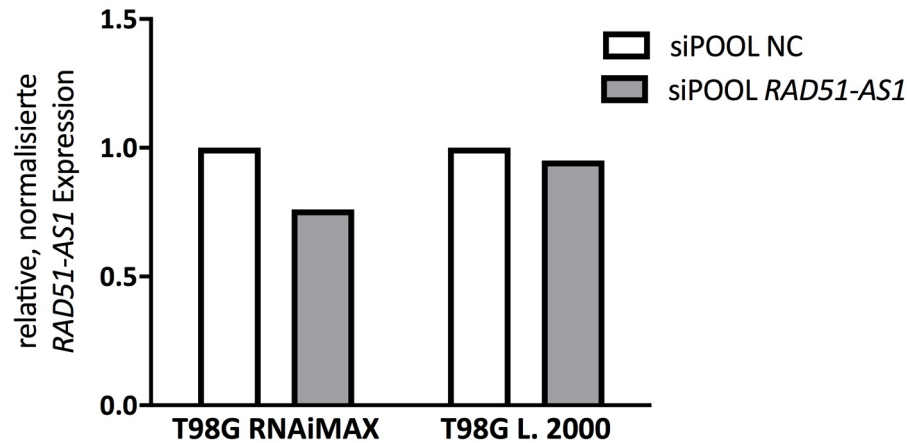


Abbildung 12: Ergebnisse der Echtzeit-RT-PCR-basierten Expressionsanalysen von *RAD51-AS1* nach dem *in vitro* Knockdown mittels siPOOL™ gegen die lncRNA *RAD51-AS1* und zwei verschiedenen Transfektionsreagenzien. 24 h nach Aussaat von 30.000 Zellen/Well in einer 24 Well-Platte wurden T98G mit 2 nM je siPOOL™ gegen die lncRNA *RAD51-AS1* transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde zum einen Lipofectamine® RNAiMAX (RNAiMAX) oder Lipofectamine® 2000 (L. 2000) verwendet. 48 h nach Transfektion wurde RNA extrahiert. Die PCR wurde mittels $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet. Als Referenzgen diente *ARF1*. Dieser Versuch wurde einmal durchgeführt mit je 2 Replikaten pro siRNA. Die Negativkontrolle wurde gleich 1 gesetzt.

In den T98G Zellen wurde 48 h nach der Transfektion mit dem siPOOL gegen die lncRNA *RAD51-AS1* und dem Transfektionsreagenz Lipofectamine® RNAiMAX eine um 24 % verminderte Expression der lncRNA im Vergleich zur Expression in den kontrolltransfizierten Zellen nachgewiesen. Im Vergleich dazu konnte in den T98G Zellen, die mit dem siPOOL gegen *RAD51-AS1* und dem Transfektionsreagenz Lipofectamine® 2000 transfiziert wurden nach 48 h nur eine um 5 % verminderte Expression erzielt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse und dem Einsatz von Lipofectamine® RNAiMAX in den Transfektionsprotokollen des Herstellers (siehe siTOOLS™ Biotech) wurden die nachfolgenden Experimente mit diesem Transfektionsreagenz durchgeführt.

3.3 Expressionsanalysen von Prognose-assoziierten lncRNAs

3.3.1 Vorarbeiten zur Auswahl der Prognose-assoziierten lncRNAs

Der dritte Teil dieser Dissertation basiert auf der Analyse eines Datensatzes der TANRIC-Datensammlung. TANRIC steht für „The atlas of non-coding RNAs in cancer“ und beinhaltet eine Patientenkohorte, die über 20 verschiedenen Krebsarten umschließt. Die Tumorgewebeproben der Patienten wurden auf die Expression von langen nicht-kodierenden RNAs (lncRNAs) hin untersucht. Die Datenbank umfasst insgesamt über 8000 Tumorproben (Stand 01/2021). 154 Proben davon stammen von Glioblastomen. Anhand der Datenbank lässt sich die Expression von lncRNAs mit der genetischen Information der Proben und klinischen Daten abgleichen. Zudem können die Expressionsraten von lncRNAs in Glioblastomen mit Normalgewebeproben wie nicht-neoplastischem Hirngewebe oder auch Proben von anderen Tumorarten verglichen werden. [245]

Für diese Arbeit wurden solche Prognose-assoziierte lncRNAs aus der TANRIC-Datensammlung ausgewählt, die die in Abb. 13 beschriebenen Kriterien erfüllten. Von 12727 lncRNAs, für die Expressionsdaten in 154 TCGA-Glioblastomproben vorhanden sind, wurden 12399 lncRNAs in Proben mit assoziierten Überlebenszeitdaten gefunden. 255 dieser lncRNAs waren mit einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ mit prognostischen Unterschieden assoziiert. Für den Vergleich der Expressionsraten und dem medianen Überleben ist es wichtig, eine nahezu identische Gruppengröße der Patienten mit differentiell exprimierten lncRNAs zu testen. Diese Anforderung konnte für 105 lncRNAs erfüllt werden. Von den 105 lncRNAs waren 97 lncRNAs mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Von diesen 97 lncRNAs wurden die nachfolgend aufgelisteten zwölf lncRNAs ausgewählt: *AL807761.3* (*ENSG00000226047*), *AC090617.5* (*ENSG00000263050*), *AC099343.4* (*ENSG00000271646*), *UBXN10-AS1* (*ENSG00000225986*), *AC011899.2* (*ENSG00000233038*), *AC145124.1* (*ENSG00000255495*), *AC068888.1* (*ENSG00000257337*), *CPEB1-AS1* (*ENSG00000259462*), *AC034243.1* (*ENSG00000253404*), *AC055874.1* (*ENSG00000259446*), *TMEM106A-AS1* (*ENSG00000236383*), *AL109615.3* (*ENSG00000237686*). Kriterien für diese Auswahl stellten hohe mediane Expressionsraten in Glioblastomen und Verbindungen zu interessanten Publikationen dar (siehe 4.3.1).

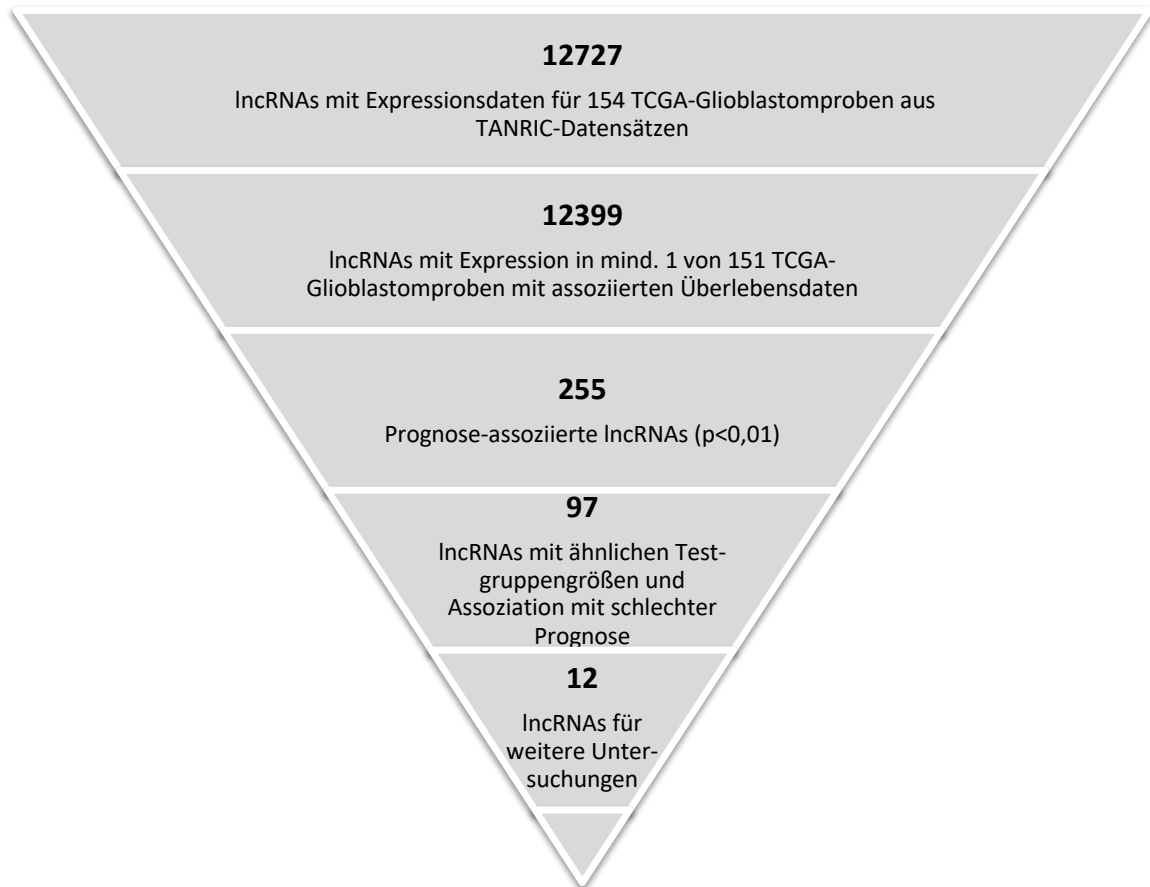


Abbildung 13: Auswahlprozess der Prognose-assoziierten lncRNAs. Ausgangspunkt waren Daten zu 12727 lncRNAs, die anhand verschiedener Kriterien gefiltert wurden, welche durch die horizontalen Balken veranschaulicht sind. Übrig blieben zwölf Kandidaten-lncRNAs, für die Primer entworfen und Optimierungen der Endpunkt-PCR-Bedingungen durchgeführt wurden.

In den Kaplan-Meier-Kurven der Abb. 14 kann man das Gesamtüberleben (OS, *Overall Survival*) der Patienten mit einer hohen Expression (rote Kurve) oder niedrigen Expression (schwarze Kurve) der jeweiligen lncRNA erkennen. Zensierungen werden durch senkrechte Striche dargestellt. Die Stufen im Diagramm repräsentieren die Sterbefälle zu dem speziellen Zeitpunkt. Es wurden nur lncRNAs mit annähernd gleicher Gruppengröße ausgewählt. Hierbei handelte es sich um je 75 Patienten mit einer hohen Expression und 76 Patienten mit einer niedrigen Expression der jeweiligen lncRNA. Bei allen zwölf Kaplan-Meier-Kurven konnte man erkennen, dass die Patienten mit einer hohen Expression der jeweiligen lncRNA (rot) ein kürzeres Gesamtüberleben (*median OS*) zeigten.

Die Ergebnisse aus den TANRIC-Datensätzen und die Kaplan-Meier-Kurven, die zu dieser Auswahl geführt haben, wurden freundlicherweise von Herrn Dr. B. Malzkorn, Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Reifenberger, zur Verfügung gestellt.

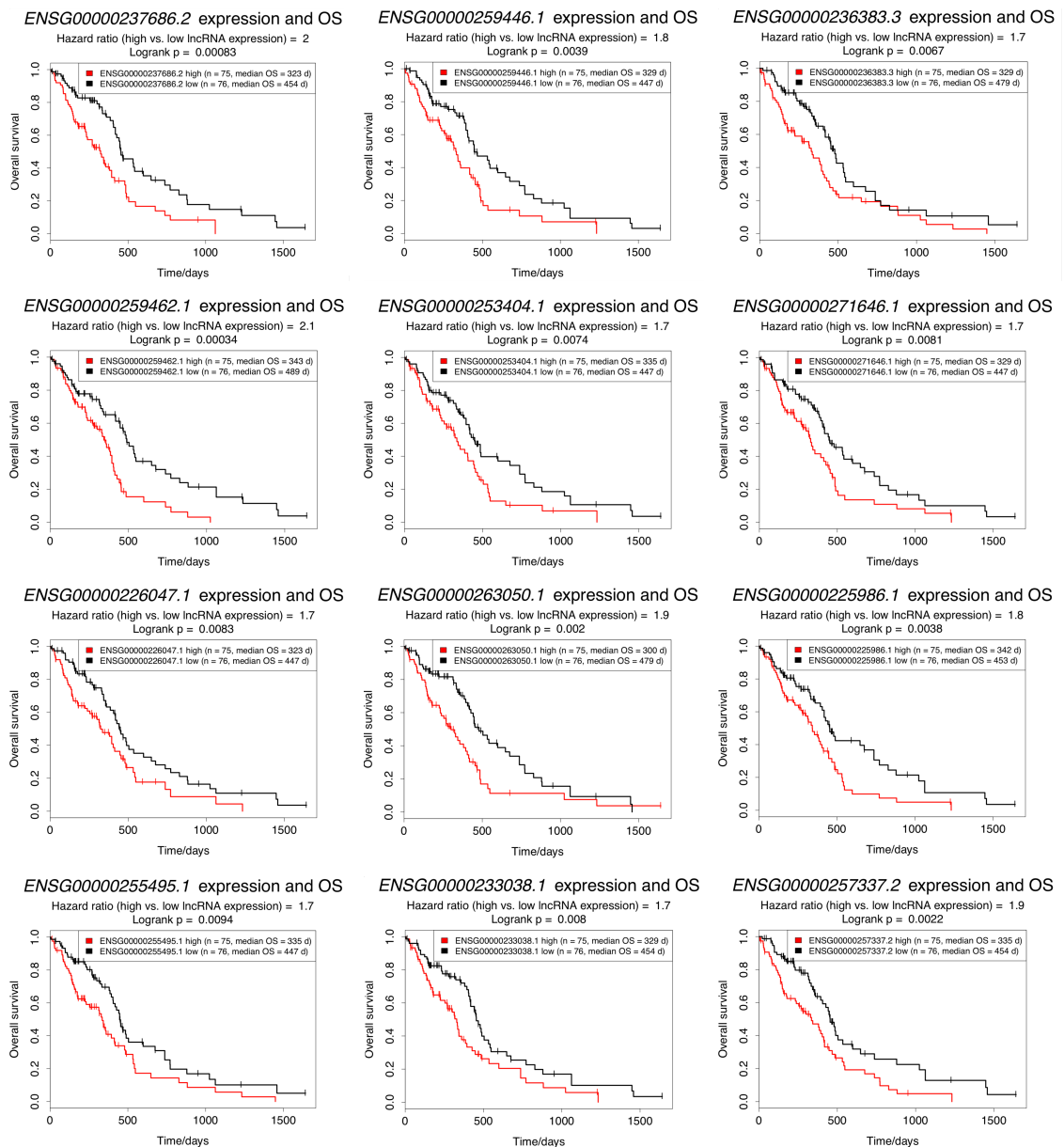


Abbildung 14: Gesamtüberleben von Glioblastompatienten in der TANRIC-Kohorte bezogen auf eine hohe oder niedrige Expression der jeweiligen Kandidaten-lncRNA im Tumorgewebe. In Schwarz dargestellt sind die Patientengruppen mit einer niedrigen lncRNA-Expression. In Rot dargestellt sind die Kurven der Patientengruppen mit einer hohen lncRNA-Expression. Zensurierungen werden durch senkrechte Striche, Sterbefälle durch Stufen repräsentiert.

Tabelle 8 gibt einen Überblick über die zwölf ausgewählten lncRNAs inklusive ENSEMBL-Nummer und Gennamen. Zusätzlich ist die Genlokalisierung aufgeführt und das *Antisense*-Gen (AS-Gen), welches komplementär zu der jeweiligen lncRNA liegt. Solche Kopf-an-Kopf Lagen können möglicherweise mit einer Interaktion der Gene einhergehen (siehe 4.1.2). [246] Weiterhin sind die Hazard-Ratio (HR), der Logrank p-Wert und das mediane Überleben (in Tagen) auf Grundlage der Kaplan-Meier-Kurven aufgeführt (siehe Abb. 14).

Ergebnisse

Tabelle 8: Überblick über die zwölf ausgewählten Kandidaten-lncRNAs, deren Expression eine Assoziation zum Gesamtüberleben von Glioblastompatienten in der TANRIC-Kohorte zeigte.

ENSEMBL-Nummer	Genname	AS-Gen	Gen-lokalisierung	HR	Logrank p-Wert	Medianes Überleben (in Tagen)
ENSG00000226047	AL807761.3	-	Chromosom 9: 107,117,459- 107,121,705 <i>reverse strand</i>	1,7	0,0083	↑ Expression: 323 ↓ Expression: 447
ENSG00000263050	AC090617.5	-	Chromosom 17: 2,043,475- 2,044,968 <i>reverse strand</i>	1,9	0,002	↑ Expression: 300 ↓ Expression: 479
ENSG00000271646	AC099343.4	-	Chromosom 4: 184,474,802- 184,477,304 <i>forward strand</i>	1,7	0,0081	↑ Expression: 329 ↓ Expression: 447
ENSG00000225986	UBXN10-AS1	UBXN10	Chromosom 1: 20,184,242- 20,186,486 <i>reverse strand</i>	1,8	0,0038	↑ Expression: 342 ↓ Expression: 453
ENSG00000233038	AC011899.2	PTPRN2	Chromosom 7: 157,854,529- 157,863,011 <i>forward strand</i>	1,7	0,008	↑ Expression: 329 ↓ Expression: 454
ENSG00000255495	AC145124.1	-	Chromosom 8: 12,194,467- 12,196,280 <i>forward strand</i>	1,7	0,0094	↑ Expression: 335 ↓ Expression: 447
ENSG00000257337	AC068888.1	EIF4B TENC1	Chromosom 12: 53,014,596- 53,054,438 <i>reverse strand</i>	1,9	0,0022	↑ Expression: 335 ↓ Expression: 454
ENSG00000259462	CPEB1-AS1	CPEB1	Chromosom 15: 82,647,770- 82,692,820 <i>forward strand</i>	2,1	0,00034	↑ Expression: 343 ↓ Expression: 489
ENSG00000253404	AC034243.1	-	Chromosom 5: 138,744,434- 138,753,309 <i>reverse strand</i>	1,7	0,0074	↑ Expression: 335 ↓ Expression: 447
ENSG00000259446	AC055874.1	RYS3	Chromosom 15: 33,303,657- 33,310,659 <i>reverse strand</i>	1,8	0,0039	↑ Expression: 329 ↓ Expression: 447
ENSG00000236383	TMEM106A-AS1	TMEM106	Chromosom 17: 43,216,941- 43,305,397 <i>reverse strand</i>	1,7	0,0067	↑ Expression: 329 ↓ Expression: 479
ENSG00000237686	AL109615.3	C6ORF223	Chromosom 6: 43,995,723- 44,074,652 <i>reverse strand</i>	2	0,00083	↑ Expression: 323 ↓ Expression: 454

Das mediane Überleben der Patienten (in Tagen) wurde abhängig von der jeweiligen lncRNA-Expression berechnet. ↑ Expression entspricht hoher Expression; ↓ Expression entspricht niedriger Expression.

3.3.2 Optimierung der PCR-Bedingungen

Für die Expressionsanalysen der ausgewählten zwölf lncRNAs (siehe Tabelle 8) wurden passende Primer für die jeweiligen lncRNAs entworfen (siehe 2.1.5). Die Expression der zwölf ausgewählten lncRNAs wurde in einer Serie aus neun Proben nicht-neoplastischen Hirngewebes (HFB, HBB, PL, TL, HBS, FL, OL, HBA, CECO (siehe Tabelle 1)), fünf diffusen Astrozytomen, IDH-mutiert (AII), fünf anaplastischen Astrozytomen, IDH-mutiert (AIII), 23 Glioblastomen, IDH-Wildtyp (GBIV) und zwölf Glioblastomzelllinien (CL) (Adhärenz wachsend: A172, CCF-STTG1, LN18, LNT229, LNT308, TP365MG, U87MG; Sphären-bildende Glioblastomstammzelllinien: GS3, GS5, GS9, GS11, GS13), getestet. Mittels Endpunkt-PCR wurden die lncRNAs in dieser Serie vervielfältigt und ihre Expression durch eine anschließende Gelelektrophorese geprüft. Bei sieben der zwölf getesteten lncRNAs zeigten sich bei der Gelelektrophorese multiple Banden. Diese Proben wurden von nachfolgenden Experimenten ausgeschlossen (Siehe Abb. 15).

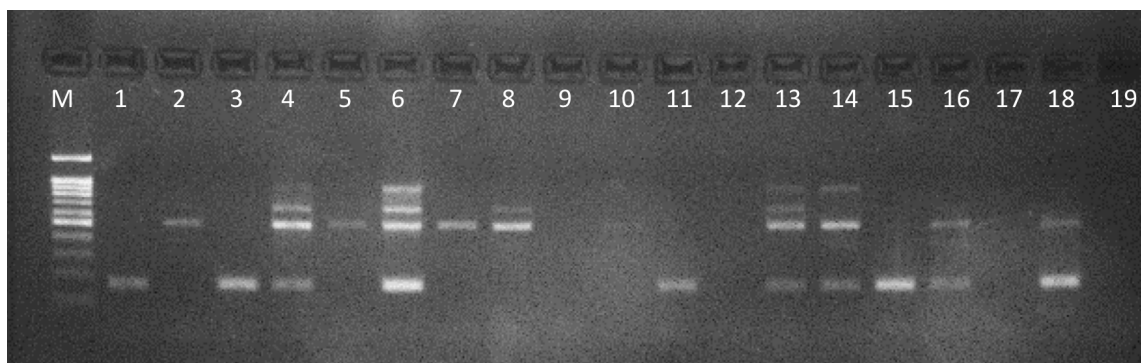


Abbildung 15: Expression der lncRNA *AC068888.1* in Glioblastomzelllinien, Glioblastomproben und Human Universal RNA (HU). Expression von *AC068888.1* in zehn verschiedenen Glioblastomzelllinien (1-10), sieben Glioblastomproben (11-17) und HU (18). Negativkontrolle ohne DNA-Probe (19); 100 Basenpaaremarker (M). Die Primer, die für diese PCR verwendet wurden, umfassen ein 154 bp-großes Amplikon. Die Expressionsanalyse erfolgte mittels Endpunkt-PCR. Anschließend erfolgte eine Gelelektrophorese in einem 3 %igem Agarosegel.

Bei fünf (*CPEB-AS1*, *TMEM106A-AS1*, *AC034243.1*, *AC055874.1* und *AL109615.3*) der zwölf lncRNAs zeigten die PCR-Produkte nach Auftrennung im Agarosegel nur eine Bande in der erwarteten Größe. Somit wurden diese fünf lncRNAs für weitere Analysen ausgewählt. Abb. 16 zeigt ein Beispiel der durchgeführten Gelelektrophorese, nach Endpunkt-PCR der lncRNA *AL109615.3* in IDH-Wildtyp Glioblastomproben.

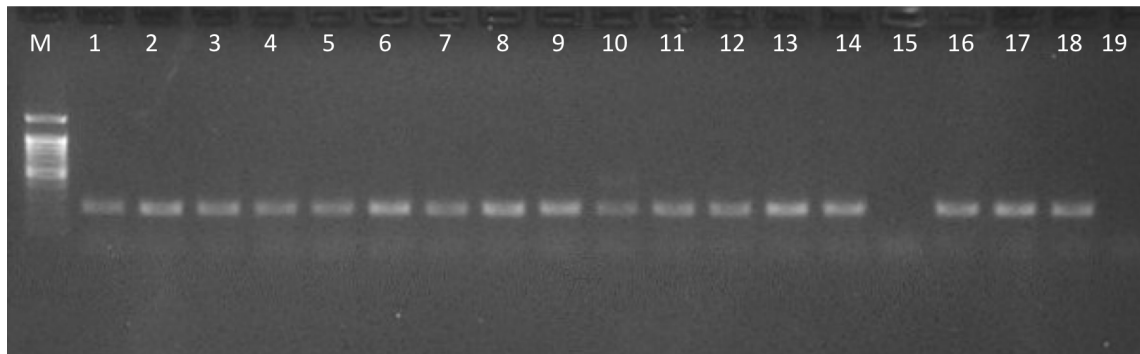


Abbildung 16: Expression von *AL109615.3* in Glioblastomproben und Human Universal RNA (HU). Expression von *AL109615.3* in 17 verschiedenen IDH-Wildtyp Glioblastomtumorproben (1 - 17), HU (18). Negativkontrolle ohne DNA-Probe (19); 100 Basenpaaremarker (M). Die Primer, die für diese PCR verwendet wurden, umfassen ein 242 bp-großes Amplikon. Die Expressionsanalyse erfolgte mittels Endpunkt-PCR, anschließend erfolgte eine Gelelektrophorese in einem 3 %igem Agarosegel.

3.3.3 Expressionsanalysen der lncRNAs *TMEM106A-AS1*, *AC055874.1* und *AL109615.3* in Gliomen und Glioblastomzelllinien

Für die fünf ausgewählten lncRNAs (*CPEB-AS1*, *TMEM106A-AS1*, *AC034243.1*, *AC055874.1*, *AL109615.3*; siehe Tabelle 8) wurden Expressionsanalysen mittels Echtzeit-RT-PCR durchgeführt. Dies erfolgte in einer Serie aus neun Proben nicht-neoplastischen Hirngewebes (HFB, HBB, PL, TL, HBS, FL, OL, HBA, CECO), fünf diffusen Astrozytomen, IDH-mutiert (AII), fünf anaplastischen Astrozytomen, IDH-mutiert (AIII), 23 Glioblastomen, IDH-Wildtyp (GBIV) und zwölf Glioblastomzelllinien (CL) (Adhärent wachsend: A172, CCF-STTG1, LN18, LNT229, LNT308, TP365MG, U87MG; Sphären-bildende Glioblastomzelllinien: GS3, GS5, GS9, GS11, GS13). Bei zwei (*CPEB-AS1*, *AC034243.1*) der fünf ausgewählten lncRNAs konnten mittels Echtzeit-RT-PCR keine verwertbaren Expressionswerte erzielt werden. Diese beiden lncRNAs wurden daher für weitere Analysen ausgeschlossen. Für die restlichen drei (*TMEM106A-AS1*, *AC055874.1*, *AL109615.3*) der ausgewählten lncRNAs konnten die Expressionsraten der jeweiligen lncRNA in den getesteten Proben bestimmt werden.

Abb. 17 zeigt die Ergebnisse der Expressionsanalysen der drei lncRNAs *TMEM106A-AS1*, *AC055874.1* und *AL109615.3* in den IDH-mutierten Astrozytomen, WHO-Grad II oder III, IDH-Wildtyp Glioblastomen (Abb. 17 A/C/E) und Glioblastomzelllinien (Abb. 17 B/D/F) im Vergleich zu nicht-neoplastischen Hirngewebe. Die Expressionsanalysen der lncRNAs erfolgten mittels Echtzeit-RT-PCR und wurden anschließend mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet. Hierbei diente *Human Adult Normal Tissue Total RNA-Brain* RNA als Kalibrator und die Expression von *ARF1* wurde als Referenz verwendet.

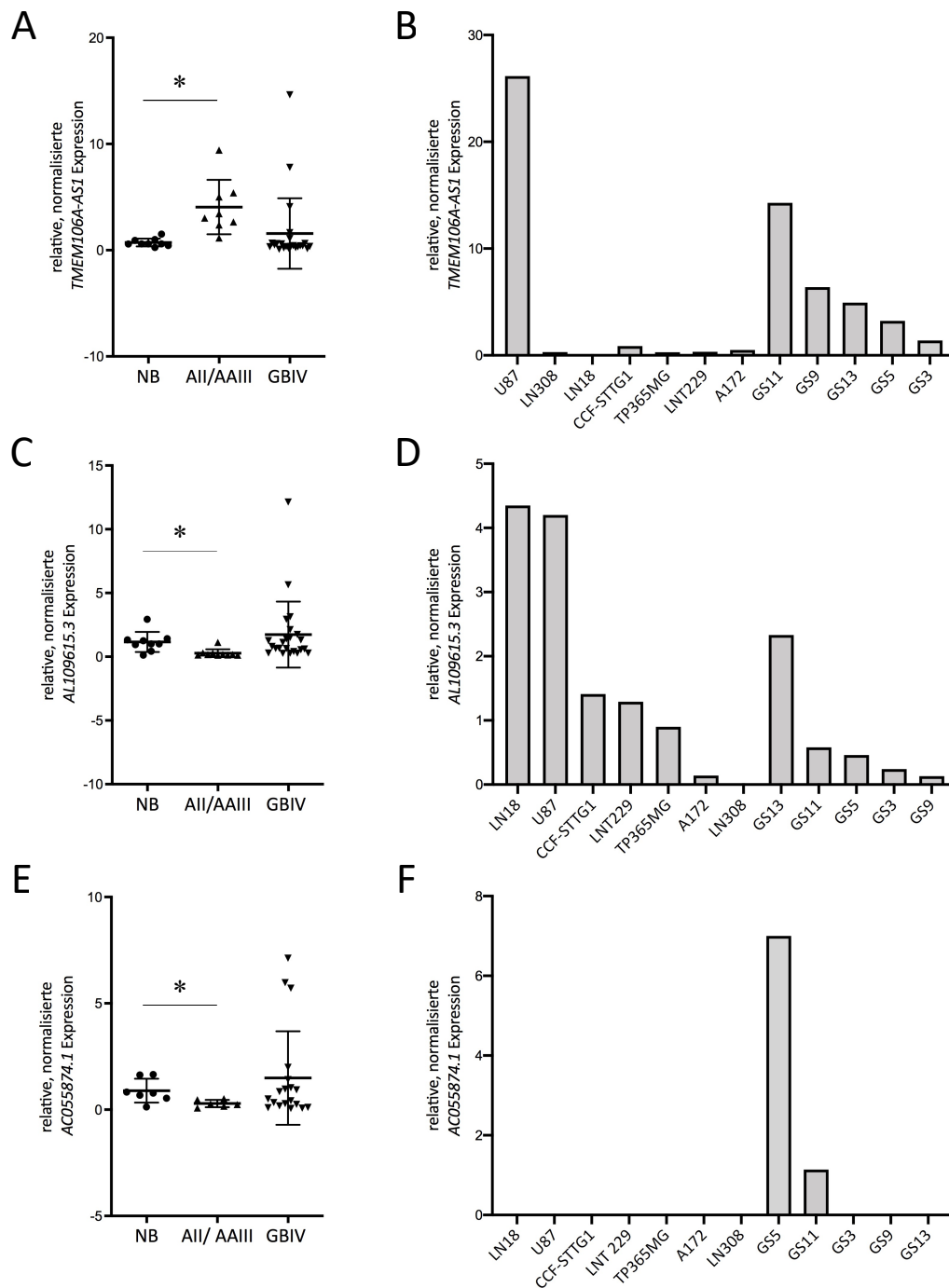


Abbildung 17: Ergebnisse der Echtzeit-RT-PCR-basierten Expressionsanalysen der lncRNAs *TMEM106A-AS1* (A/B), *AL109615.3* (C/D) und *AC055874.1* (E/F). Die PCR wurde mittels $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet. *Human Adult Normal Tissue Total RNA-Brain* diente als Kalibrator. Die Expression von *ARF1* wurde als Referenz verwendet. Die Signifikanztestung erfolgte im ungepaarten t-Test. **A/B:** Expressionsanalysen der lncRNA *TMEM106A-AS1*. Es wurden neun Proben nicht-neoplastischen Hirngewebes (NB), acht IDH-mutierte diffuse (WHO-Grad II) und anaplastische (WHO-Grad III) Astrozytome (AII/AI), 23 IDH-Wildtyp Glioblastome (GBIV) (A) und zwölf Glioblastomzelllinien (B) untersucht. **C/D:** Expressionsanalysen der lncRNA *AL109615.3*. Es wurden neun NB, zehn AII/AI, 23 GBIV (C) und zwölf Glioblastomzelllinien (D) untersucht. **E/F:** Expressionsanalysen der lncRNA *AC055874.1*. Es wurden sieben NB, sechs AII/AI, 19 GBIV (E) und zwölf Glioblastomzelllinien (F) untersucht. Signifikante Unterschiede (*) zeigten sich zwischen den NB und AII/AI Gruppen.

Im Rahmen der Expressionsanalysen der lncRNA *TMEM106A-AS1* war eine signifikant erhöhte Expression ($p=0,0015$) in den AII/AIII-Tumorproben (Mittelwert der *TMEM106A-AS1*-Expression in AII/AIII: 4,06; SD: 2,57) im Vergleich zum nicht-neoplastischen Hirngewebe (Mittelwert der *TMEM106A-AS1*-Expression in NB: 0,72; SD: 0,37) nachzuweisen (Abb. 17A). Weiterhin zeigte sich eine im Mittel leicht erhöhte Expression dieser lncRNA in den Glioblastom-Tumorproben (Mittelwert der *TMEM106A-AS1*-Expression in GBIV: 1,57; SD: 3,31) im Vergleich zum nicht-neoplastischen Hirngewebe (Abb. 17A). Aufgrund der starken Abweichung der 23 Messwerte fand sich hier allerdings keine Signifikanz. Auch bei einer Zusammenführung aller Tumoren (AII/AIII und GBIV) ergab sich aufgrund der starken Abweichungen der 31 Messwerte kein signifikanter Unterschied der Expression im Vergleich zu nicht-neoplastischen Hirngewebe ($p=0,18$). Zusätzlich zu den Expressionsanalysen der Tumorproben wurde die Expression der lncRNA *TMEM106A-AS1* in Glioblastomzelllinien bestimmt, um mögliche Zelllinien für einen *in vitro* Knockdown mittels siRNA-Pools und anschließende funktionelle Analysen zu identifizieren (Abb. 17B). Hierbei zeigte die lncRNA *TMEM106A-AS1* in der Zelllinie U87MG (Expression von *TMEM106A-AS1* in U87MG: 26,15) und in der Glioblastomstammzelllinie GS11 (Expression von *TMEM106A-AS1* in GS11: 14,28) die höchsten Expressionsraten. Diese zwei Zelllinien wurden somit für einen siRNA-gesteuerten *in vitro* Knockdown als geeignet erachtet.

Bei den Expressionsanalysen der lncRNA *AL109615.3* ließ sich eine signifikant verminderte Expression ($p=0,0042$) in den AII/AIII-Tumorproben (Mittelwert *AL109615.3*-Expression in AII/AIII: 0,27; SD: 0,30) im Vergleich zum nicht-neoplastischen Hirngewebe feststellen (Mittelwert *AL109615.3*-Expression in NB: 1,16; SD: 0,79) (Abb. 17C). Zusätzlich war eine im Mittel leicht erhöhte Expression der lncRNA in den Glioblastomproben (Mittelwert *AL109615.3*-Expression in GBIV: 1,74; SD: 2,59) im Vergleich zum nicht-neoplastischen Hirngewebe nachzuweisen (Abb. 17C). Aufgrund der starken Abweichung der 23 Messwerte waren die Unterschiede allerdings nicht signifikant. Im Rahmen der Analysen konnte man jedoch ein gewisses Expressionsmuster der lncRNA *AL109615.3* nachweisen. 17 Glioblastomproben zeigten eine etwas geringere oder ähnlich hohe Expression von *AL109615.3* wie die NB-Proben. Bei vier der Glioblastomproben zeigte sich eine leicht erhöhte Expression dieser lncRNA im Vergleich zu den NB-Proben. Zwei der Glioblastomproben zeigten mit den Werten 5,64 und 12,13 eine deutlich höhere Expression von *AL109615.3* im Vergleich zu den

NB-Proben bzw. der Mehrheit der Glioblastomproben (Abb. 17C). Neben den Tumorproben wurde die *AL109615.3*-Expression auch in Glioblastomzelllinien bestimmt, um mögliche Zelllinien für einen *in vitro* Knockdown mittels siRNA-Pools und anschließende funktionelle Analysen zu identifizieren. Hierbei zeigten die Zelllinien LN18 (Expression von *AL109615.3* in LN18: 4,35) und U87MG (Expression von *AL109615.3* in U87MG: 4,20) die höchsten Expressionsraten der lncRNA *AL109615.3* (Abb. 17D). Diese zwei Zelllinien wurden somit für einen siRNA-basierten *in vitro* Knockdown als geeignet erachtet.

Anhand der Expressionsanalysen der lncRNA *AC055874.1* konnte ebenfalls eine signifikant verminderte Expression ($p=0,029$) der lncRNA in den AII/AIII-Tumorproben (Mittelwert *AC055874.1*-Expression in AII/AIII: 0,29; SD: 0,17) im Vergleich zum nicht-neoplastischen Hirngewebe (Mittelwert *AC055874.1*-Expression in NB: 0,89; SD: 0,56) festgestellt werden (Abb. 17E). Weiterhin fand sich eine im Mittel leicht erhöhte Expression dieser lncRNA in den Glioblastomproben (Mittelwert *AC055874.1*-Expression in GBIV: 1,48; SD: 2,20) im Vergleich zum nicht-neoplastischen Hirngewebe (Abb. 17E). Ähnlich wie für die lncRNA *AL109615.3* war auch für die lncRNA *AC055874.1* ein bestimmtes Expressionsmuster zu erkennen. In 14 Glioblastomproben zeigte sich eine geringere oder ähnlich hohe Expression von *AC055874.1* wie in den NB-Proben. In zwei der Glioblastomproben konnte eine leicht erhöhte Expression nachgewiesen werden. Drei der Glioblastomproben zeigten mit den Werten 5,71, 5,97 und 7,12 eine deutlich höhere Expression im Vergleich zu den NB-Proben bzw. der Mehrheit der Glioblastomproben (Abb. 17E). Im Rahmen der Expressionsanalysen von Glioblastomzelllinien war nur in zwei von zwölf Zelllinien eine erhöhte Expression der lncRNA *AC055874.1* nachweisbar. Hierbei zeigten die Zelllinien GS5 (Expression von *AC055874.1* in GS5: 7,00) und GS11 (Expression von *AC055874.1* in GS11: 1,14) eine erhöhte *AC055874.1*-Expression. Die Zelllinie GS5 wäre durch die deutlich erhöhte Expression der lncRNA *AC055874.1* im Vergleich zu den NB ein geeigneter Kandidat für einen nachfolgenden siRNA-basierten *in vitro* Knockdown.

3.3.4 Subzelluläre Lokalisation der lncRNA *AL109615.3*

In Vorarbeiten wurden die lncRNAs auf ihre Lokalisation innerhalb der Zelle geprüft. Hierzu wurde zunächst nukleäre und zytoplasmatische RNA getrennt voneinander extrahiert [247]. Anschließend wurden Expressionsanalysen der jeweiligen lncRNA in den beiden Kompartimenten durchgeführt. Für *AL109615.3* ergab sich in dieser Untersuchung eine vermehrte Expression im Zytoplasma im Vergleich zum Zellkern in U87MG Glioblastomzellen (Abb. 18). Diese Ergebnisse wurden freundlicherweise von Frau Dr. M. Wolter, Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Reifenberger, zur Verfügung gestellt.

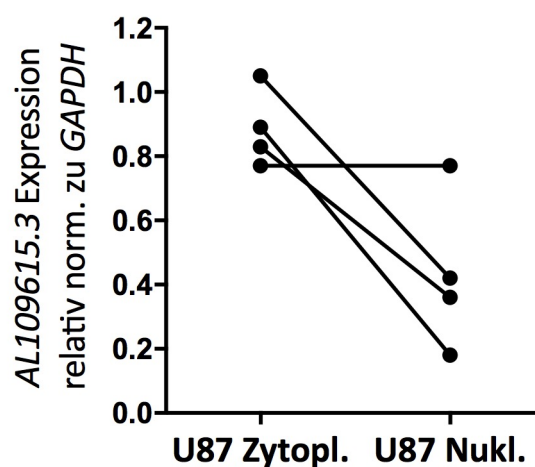


Abbildung 18: Nachweis einer stärkeren Expression der lncRNA *AL109615.3* im Zytoplasma im Vergleich zum Zellkern in U87MG Glioblastomzellen. Gezeigt sind die Ergebnisse der Echtzeit-RT-PCR-basierten Expressionsanalysen von *AL109615.3* in U87MG Zellen nach gesonderter Extraktion von zytoplasmatischer und nukleärer RNA. Die PCR wurde mittels $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet.

3.3.5 Auswahl der lncRNA *AL109615.3* für funktionelle Untersuchungen in kultivierten Glioblastomzellen

Anhand Abb. 19 kann man den weiteren Auswahlprozess der zwölf Prognose-assoziierten Kandidaten-lncRNAs verfolgen (Fortsetzung von Abb. 13). Es wurden für alle zwölf lncRNAs Primer entworfen, allerdings konnte die Endpunkt-PCR nur für fünf lncRNAs etabliert werden. Von diesen fünf wurde für drei lncRNAs Analysen mittels Echtzeit-RT-PCR durchgeführt. Für die *AL109615.3* war eine stärkere Expression im Zytoplasma nachweisbar. In diversen Studien wurde eine erhöhte Effizienz eines siRNA-basierten *in vitro* Knockdowns bei hoher zytoplasmatischer Expression einer lncRNA gezeigt [248-250]. Aufgrund dessen wurde die lncRNA *AL109615.3* für die Etablierung

eines siRNA-basierten *in vitro* Knockdowns und nachfolgende funktionelle Analysen ausgewählt.

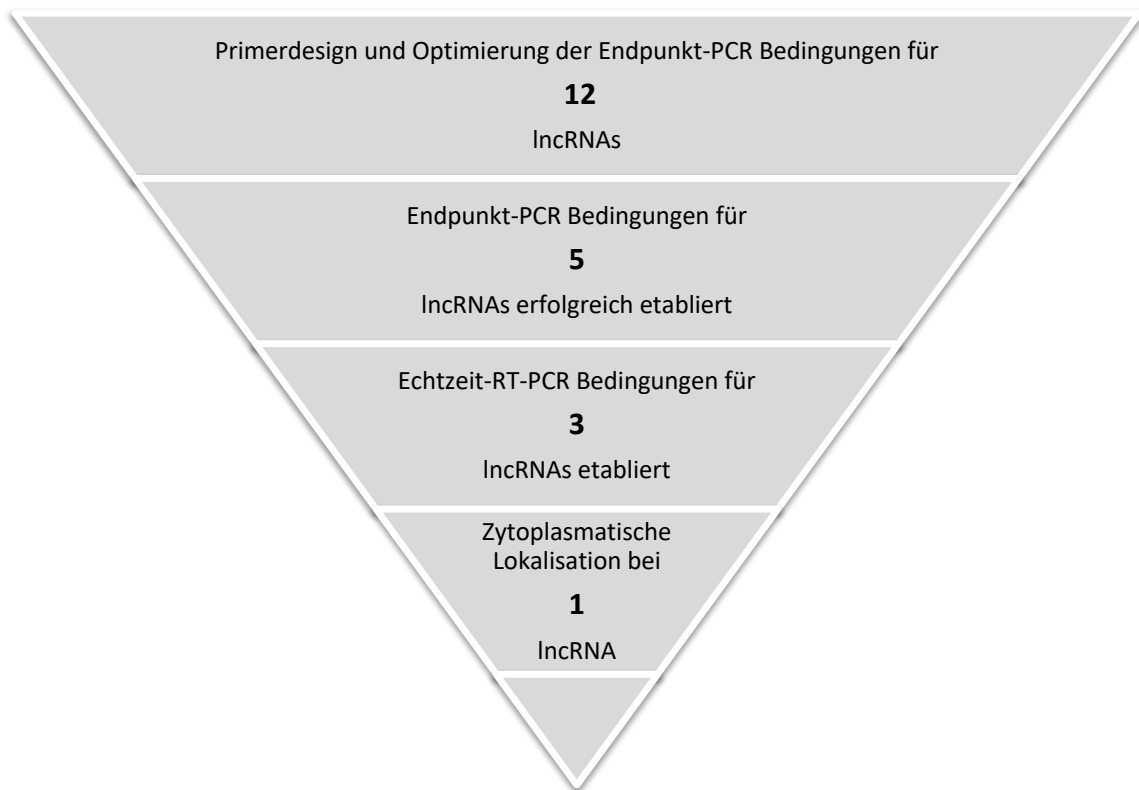


Abbildung 19: Auswahlprozess der Prognose-assoziierten Kandidaten-lncRNAs für funktionelle *in vitro* Analysen (Fortsetzung der Abb. 13). Zwölf lncRNAs, die anhand verschiedener Kriterien gefiltert wurden, durch die horizontalen Balken veranschaulicht. Eine lncRNA (*AL109615.3*) wurde aufgrund der Ergebnisse der Analysen mittels in Endpunkt-PCR und Echtzeit-RT-PCR, sowie des Nachweises einer zytoplasmatischen Expression für weitere funktionelle Analysen ausgewählt.

3.4 Funktionelle Analyse von *AL109615.3* in Glioblastomzellen

Zur Herunterregulation von *AL109615.3* wurden U87MG Glioblastomzellen mit siRNA-Pools transfiziert. Die U87MG Zellen zeigten zuvor in Echtzeit-RT-PCR-basierten Expressionsanalysen eine hohe Expression von *AL109615.3* (siehe Abb. 17D). Der siPOOL™ bestand aus 30 einzelnen, gegen verschiedene Sequenzbereiche von *AL109615.3* gerichteten, siRNAs (siehe 3.3.2). Durch eine Anlagerung an *AL109615.3* konnte so die lncRNA gespalten und die Expression von *AL109615.3* minimiert werden. Nachfolgend sollten Analysen zu den Auswirkungen des *AL109615.3*-Knockdowns auf die Apoptoserate, Proliferationsrate, das Wachstum und die Vitalität der U87MG Zellen durchgeführt werden. Als Kontrolle für mögliche Nebeneffekten der siRNA-Transfektion diente ein *Negative control* siPOOL (siPOOL NC).

3.4.1 Optimierung und Validierung des Knockdowns von *AL109615.3* nach Transfektion von U87MG Zellen mit siRNA-Pools

Für die nachfolgenden funktionellen Analysen musste zunächst ein effizienter Knockdown von *AL109615.3* etabliert werden. Hierzu wurde ein siPOOL™ verwendet. Der effizienteste Knockdown wurde mit folgendem Protokoll erzielt: Die U87MG Zellen wurden in einer Dichte von 10.000 Zellen/Well in 24 Well-Zellkulturschalen in 500 µl DMEM mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin ausgesät. 24 h nach Aussaat, wurden die Zellen mit je 2 nM siPOOL gegen die *lncRNA AL109615.3* (siPOOL *AL*) bzw. 2 nM *Negative control* siPOOL (siPOOL NC) nach Protokoll (siehe 2.2.8) transfiziert. Die Transfektion erfolgte jeweils in Duplikaten. Die RNA wurde 72 h nach Transfektion mittels TRIzol™ extrahiert und in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.2). Die Expressionsanalysen von *AL109615.3* erfolgten mittels Echtzeit-RT-PCR und wurden anschließend mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet. Hierbei diente *Human universal reference* RNA als Kalibrator, die Expression von *ARF1* wurde als Referenz verwendet. Mittels siPOOL™ konnte in drei unabhängigen Versuchen ein signifikanter ($p < 0,0001$) Knockdown von *AL109615.3* in U87MG Zellen von jeweils über 90 % erzielt werden (Abb. 20).

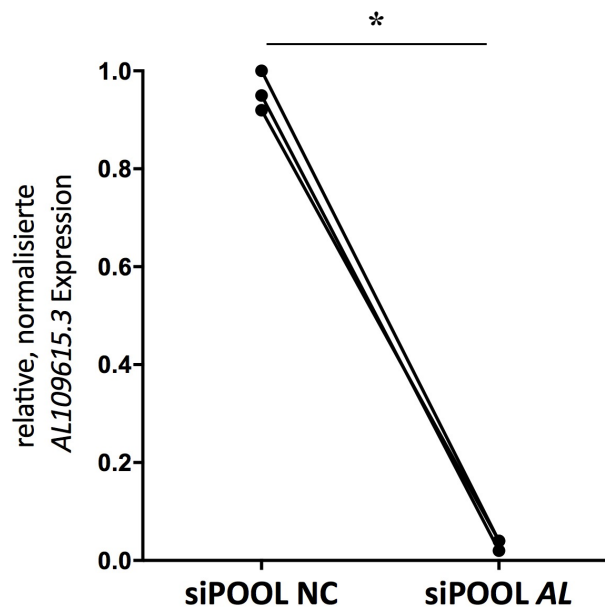


Abbildung 20: Echtzeit-RT-PCR Expressionsanalysen der *lncRNA AL109615.3* nach dem *in vitro* Knockdown mittels siPOOL™ gegen *AL109615.3*. 24 h nach Aussaat von 10.000 Zellen/Well wurden U87MG Zellen mit je 2 nM siPOOL gegen *AL109615.3* (siPOOL *AL*) oder 2 nM *Negative control* siPOOL (siPOOL NC) transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurde die RNA extrahiert. Die PCR wurde mittels $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet. Als Referenzgen diente *ARF1*. Die Signifikanztestung erfolgte im gepaarten t-Test, *, $p < 0,05$. In allen drei unabhängigen Versuchen wurde jeweils ein Knockdown von über 90 % erzielt.

3.4.2 Bestimmung der Apoptoserate von U87MG Zellen nach Knockdown von *AL109615.3*

Für die Bestimmung der Apoptoserate wurden die U87MG Zellen, wie in 3.4.1 beschrieben, ausgesät und mittels siPOOL™ transfiziert. 72 h nach der Transfektion, wurde die Caspase-3/7-Aktivität bestimmt. Dies erfolgte mittels Caspase-Glo® 3/7-Assay (siehe 2.2.11). Anschließend wurde die Apoptoserate zwischen den mit siPOOL gegen die lncRNA *AL109615.3* (siPOOL *AL*) -transfizierten und den mit *Negative control* siPOOL-transfizierten U87MG Zellen verglichen. Bei einem der Versuche stieg die Apoptoserate nach dem Knockdown von *AL109615.3* leicht an, bei einem war die Apoptoserate in etwa gleich mit der Negativkontrolle. In einem der Versuche konnte nach dem Knockdown von *AL109615.3* eine Verringerung der Apoptoserate von ca. 40 % festgestellt werden (Abb. 21). Insgesamt zeigte sich somit kein konsistenter Effekt des Knockdowns auf die Apoptoseaktivität.

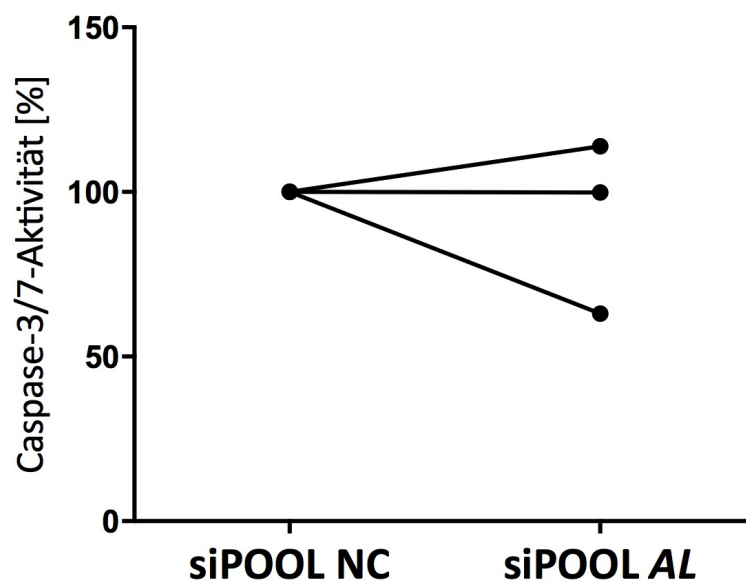


Abbildung 21: Effekte des *AL109615.3*-Knockdowns auf die Caspase-3/7-Aktivität der U87MG Glioblastomzellen. 24 h nach Aussaat wurden U87MG Zellen mit je 2 nM siPOOL gegen *AL109615.3* (siPOOL *AL*) oder 2 nM *Negative control* siPOOL (siPOOL NC) transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurde die Caspase-3/7-Aktivität mittels Caspase-Glo® 3/7-Assay bestimmt. Die Negativkontrolle wurde jeweils als 100 % definiert. Die Signifikanztestung erfolgte im gepaarten t-Test.

3.4.3 Bestimmung der Proliferationsrate von U87MG Zellen nach Knockdown von *AL109615.3*

Für die Bestimmung der Proliferationsrate wurden die U87MG Zellen wie in 3.4.1 beschrieben ausgesät und mittels siPOOL™ transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurde der BrdU-Einbau bestimmt. Der BrdU-Einbau wurde als Surrogatparameter für die Proliferationsrate untersucht. Dies erfolgte mittels Cell-Proliferation-ELISA-BrdU (siehe 2.2.9). Anschließend wurde der BrdU-Einbau zwischen den mit siPOOL gegen die lncRNA *AL109615.3* (siPOOL *AL*)-transfizierten und den mit *Negative control* siPOOL (siPOOL NC)-transfizierten U87MG Zellen verglichen. In drei unabhängigen Versuchen zeigte sich eine Verringerung des BrdU-Einbaus in den Knockdown-Zellen. Hierbei konnte eine jeweils über 50 %ige Reduktion der Proliferationsrate ($p=0,0125$) festgestellt werden (Abb. 22).

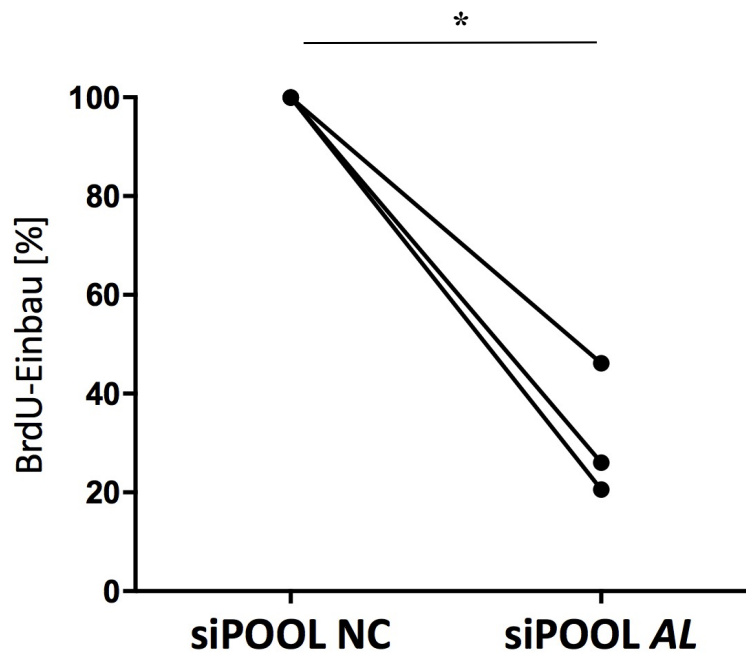


Abbildung 22: Effekte des *AL109615.3*-Knockdowns auf den BrdU-Einbau in U87MG Glioblastomzellen. 24 h nach Aussaat wurden die U87MG Zellen mit je 2 nM siPOOL gegen *AL109615.3* (siPOOL *AL*) oder 2 nM *Negative control* siPOOL (siPOOL NC) transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurde der BrdU-Einbau mittels Cell-Proliferation-ELISA-BrdU bestimmt. Der BrdU-Einbau wurde als Surrogatparameter für die Proliferationsrate untersucht. Die Negativkontrolle wurde jeweils als 100 % definiert. Die Signifikanztestung erfolgte im gepaarten t-Test, *, $p < 0,05$.

3.4.4 Bestimmung der Vitalität von U87MG Zellen nach Knockdown von *AL109615.3*

Für die Bestimmung der Vitalität wurden die Zellen wie in 3.4.1 beschrieben ausgesät und mittels siPOOL™ transfiziert. 72 h nach Transfektion wurde der ATP-Gehalt bestimmt. Dies erfolgte mittels CellTiter-Glo®-Cell-Viability-Assay (siehe 2.2.10). Der ATP-Gehalt wurde hierbei als Surrogatparameter für die Vitalität der Glioblastomzellen untersucht. Anschließend wurde der ATP-Gehalt zwischen den mit siPOOL gegen die lncRNA *AL109615.3*-transfizierten und den mit *Negative control* siPOOL (siPOOL NC)-transfizierten U87MG Zellen verglichen. In drei unabhängigen Versuchen zeigte sich eine (nicht signifikante) Tendenz zur Abnahme der Vitalität in den mit siPOOL gegen *AL109615.3*-transfizierten Zellen. Bei einem der Versuche blieb die Vitalität etwa gleich, bei den anderen Beiden konnte eine leichte Abnahme der Vitalität festgestellt werden (Abb. 23).

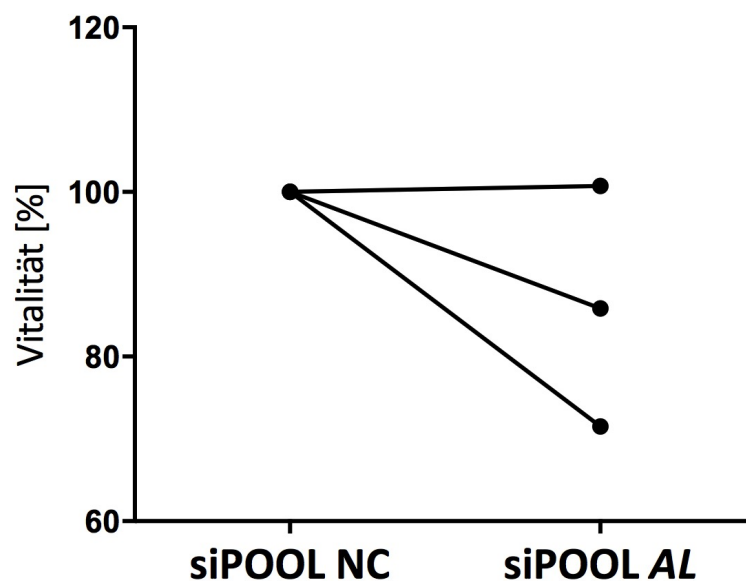


Abbildung 23: Effekte des *AL109615.3*-Knockdowns auf die Vitalität von U87MG Glioblastomzellen. 24 h nach Aussaat wurden die U87MG Zellen mit je 2 nM siPOOL gegen *AL109615.3* (siPOOL AL) oder 2 nM *Negative control* siPOOL (siPOOL NC) transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurde der ATP-Gehalt mittels CellTiter-Glo® - Cell-Viability-Assay bestimmt. Ein verminderter ATP-Gehalt gilt als Surrogatparameter für eine verminderte Vitalität der Zellen. Die Negativkontrolle wurde jeweils als 100 % definiert. Die Signifikanztestung erfolgte im gepaarten t-Test.

3.4.5 Wachstumsanalysen der U87MG Zellen nach Knockdown von *AL109615.3*

Für die Messung der Wachstumsrate wurden die Zellen wie in 3.4.1 beschrieben ausgesät und mittels siPOOL™ gegen *AL109615.3* transfiziert. 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion wurde die Zellzahl bestimmt. Dies erfolgte mittels Standard-Trypanblau Methode mit dem ViCELL™-XR-Cell-Counter (siehe 2.2.13). Sowohl in den Zellen, in denen mittels siPOOL gegen *AL109615.3* (siPOOL *AL*) ein Knockdown der lncRNA generiert wurde, als auch in den mit dem *Negative control* siPOOL (siPOOL NC) -transfizierten U87MG Zellen konnte ein Wachstumsanstieg im Verlauf nachgewiesen werden. Nach 24 h waren bei beiden Wachstumsanalysen ca. 30.000 Zellen/Well zu erkennen. Nach 72 h waren es bei den Negativkontrollen rund 80.000 Zellen/Well, bei den siPOOL gegen *AL109615.3*-transfizierten Zellen rund 50.000 Zellen/Well. Der Wachstumsanstieg fiel somit nach der Herunterregulation von *AL109615.3* geringer aus (Abb. 24).

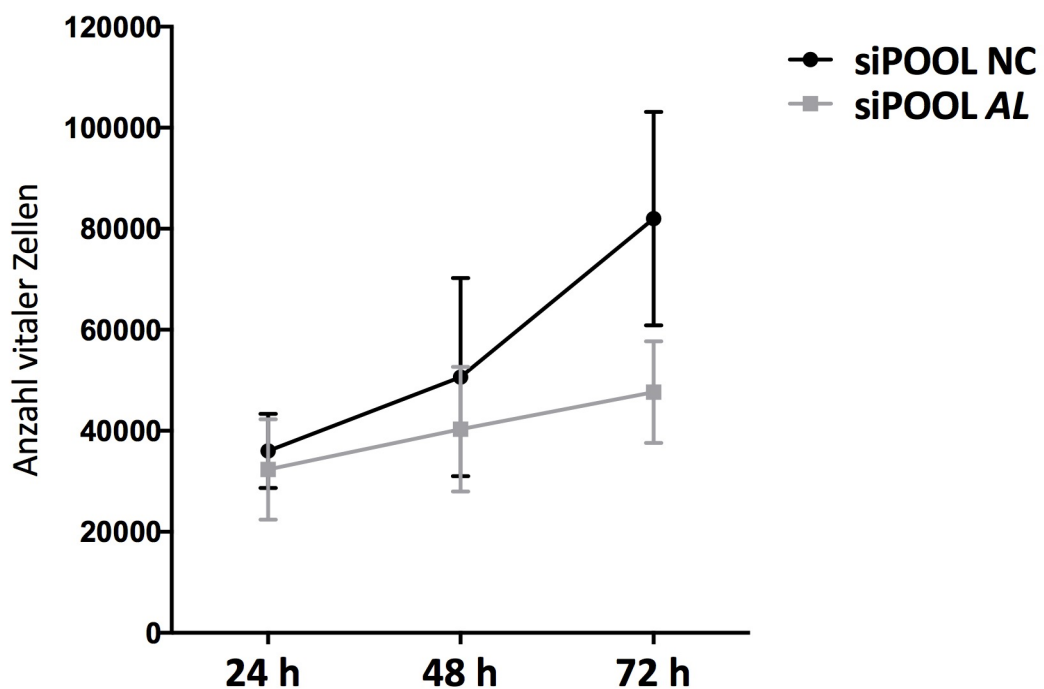


Abbildung 24: Effekte des *AL109615.3*-Knockdowns auf das Wachstum und die Vitalität von U87MG Zellen. 24 h nach der Aussaat wurden U87MG Zellen mit je 2 nM siPOOL gegen *AL109615.3* (siPOOL *AL*) oder 2 nM *Negative control* siPOOL (siPOOL NC) transfiziert. 24 h, 48 h und 72 h nach der Transfektion wurde die Zellzahl bestimmt. Dies erfolgte mittels Standard-Trypanblau Methode im ViCELL™-XR-Cell-Counter. Die Punkte stellten den Mittelwert von drei Replikaten dar. Die Fehlerbalken repräsentierten die Standardabweichung. Die Signifikanztestung erfolgte im gepaarten t-Test. Die Signifikanzniveaus wurden für multiples Testen Bonferroni-korrigiert.

3.4.6 Durchflusszytometrische Analyse der U87MG Zellen nach Knockdown von *AL109615.3*

Für die Bestimmung der Apoptose- und Nekroseraten wurden die Zellen wie in 3.4.1 beschrieben ausgesät und mittels siPOOL™ gegen *AL109615.3* transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit dem CellEvent™-Caspase-3/7-Green-Flow-Cytometry Assay Kit (siehe 2.2.12) behandelt und anschließend durchflusszytometrisch in einem MoFlo™ XDP, Flow Cytometer Cell Sorter analysiert. Dies geschah zur Differenzierung von nekrotischem und apoptotischem Zelltod. Diese Untersuchung diente zur gezielteren Analyse der Zellveränderung nach der Transfektion mit dem siPOOL™. In Abb. 25 kann man erkennen, dass die Zellen durchflusszytometrisch in vier verschiedene Kategorien eingeteilt wurden. Vitale Zellen, nekrotische Zellen, apoptotische Zellen und solche die von apoptotisch zu nekrotisch wurden. Es wurden alle Zellen und Zellfragmente mitgetestet. Diese ergaben insgesamt 100 %. Anschließend ließen sich die Zellen und Zellfragmente den vier Gruppen zuordnen. Bei den kontrolltransfizierten Zellen waren nach 72 h ca. 21 % nekrotisch, ca. 76 % vital, weniger als 3 % befanden sich in den Kategorien apoptotisch und apoptotisch zu nekrotisch. Bei den mit dem siPOOL gegen die lncRNA *AL109615.3*-transfizierten Zellen waren nach 72 h ca. 27 % nekrotisch, 70 % vital und ebenfalls weniger als 3 % den Kategorien apoptotisch, bzw. apoptotisch zu nekrotisch zuzuordnen. Diese Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Versuchen erzielt. Es konnten keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden.

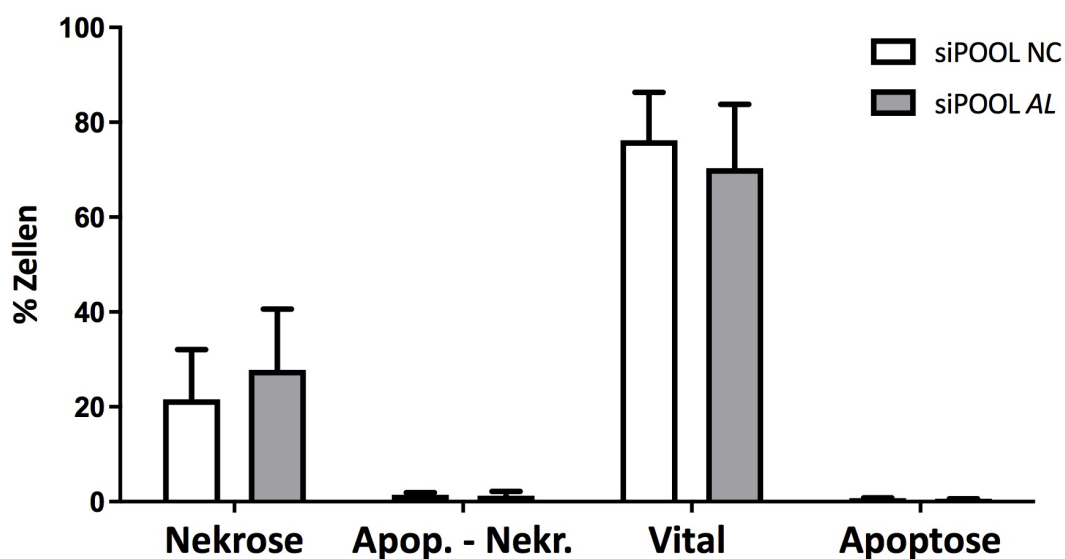


Abbildung 25: Effekte des *AL109615.3*-Knockdowns auf die Apoptose- und Nekroserate in U87MG Zellen. 24 h nach der Aussaat wurden U87MG Zellen mit je 2 nM siPOOL gegen *AL109615.3* (siPOOL *AL*) oder 2 nM *Negative control* siPOOL (siPOOL NC) transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit dem CellEvent™-Caspase-3/7-Green-Flow-Cytometry Assay Kit behandelt und anschließend mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie in einem MoFlo™ XDP, Flow Cytometer Cell Sorter analysiert. 100% der Zellen und Zellfragmente wurden auf diese Art in die vier verschiedenen Untergruppen aufgeteilt. Die Balken repräsentierten den Mittelwert, die Fehlerbalken die Standardabweichung (n=3). Die Signifikanztestung erfolgte im gepaarten t-Test. Die Signifikanzniveaus wurden für multiples Testen Bonferroni-korrigiert. Es konnten keine signifikanten Unterschiede nach Knockdown von *AL109615.3* nachgewiesen werden.

4. Diskussion

4.1 Zusammenhang zwischen der Expression von *RAD51-AS1* und *RAD51* in Glioblastomzelllinien und Glioblastomen

Im ersten Teil dieser Dissertation steht der mögliche Zusammenhang zwischen der lncRNA *RAD51-AS1* und dem DNA-Reparaturgen *RAD51* im Mittelpunkt. Beide Gene liegen Kopf-an-Kopf auf dem Chromosom 15 (siehe 3.1.1, Abb. 3). Diese sogenannte Kopf-an-Kopf Lage geht oft einher mit Interaktionen zwischen zwei Genen. [227-229] Diverse Studien zeigten in der Vergangenheit eine stark erhöhte Expression von *RAD51* in therapieresistenten Glioblastomzellen. Ein Knockdown von *RAD51* führte zudem in weiteren Untersuchungen zu einer verbesserten Ansprechrate auf TMZ. [232-234]

Mittels Mikroarray-Expressionsanalysen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Guido Reifenberger in Zusammenarbeit mit Daniel Picard (Universitätsklinikum Düsseldorf, Klinikum für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Mark Remke) wurde die Expression von lncRNAs in parentalen und TMZ-resistenten Glioblastomzelllinien untersucht. [235] Hierbei stellte sich unter anderem eine erhöhte Expression der lncRNA *RAD51-AS1* in parentalen im Vergleich zur Expression in den TMZ-resistenten Glioblastomzelllinien dar (siehe 3.1.1, Abb. 4).

Die genomischen Kopf-an-Kopf Lage von *RAD51-AS1* und *RAD51*, die mehrfach publizierte erhöhte Expression von *RAD51* in resistenten Glioblastomzellen, sowie die anhand der Mikroarray-Expressionsanalysen vermutete erhöhte Expression von *RAD51-AS1* in den parentalen Glioblastomzelllinien führten zu der Frage nach einem möglichen Zusammenhang der Expression von *RAD51-AS1* und *RAD51* in Glioblastomen.

4.1.1 Bedeutung des DNA-Reparaturgens *RAD51* in Glioblastomen

Verschiedene externe und interne Einflüsse können zu DNA-Veränderungen und so unter anderem zu Doppelstrangbrüchen (DSB) führen. In so einem Fall gibt es verschiedenste Mechanismen, um die DNA wieder zu reparieren. Eine der häufigsten Mechanismen ist die homologe Rekombination. Diese wird unter anderem durch eine Anlagerung von *RAD51* an die einzelsträngige DNA initiiert. *RAD51* interagiert mit diversen anderen Proteinen, unter anderem im Komplex mit *BRCA1*, *BRCA2* [251, 252] und auch dem

Tumorsuppressorprotein p53. [253-255] Eine Beeinträchtigung dieser Reparaturmaßnahmen führt zu zellulären Schäden. So können fehlerhafte Abläufe bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen zu immunologischen Störungen führen [256, 257], Entwicklungsstörungen bedingen [256, 258] oder auch die Krebsentstehung, sowie die Resistenzentwicklung gegenüber Therapiemaßnahmen fördern. [259, 260] In Versuchen mit Mäusen wurde herausgefunden, dass es nach Knockdown von *RAD51* zum frühen embryonalen Tod kam. Dies macht die Tragweite dieses DNA-Reparaturmechanismus und auch von *RAD51* deutlich. [261, 262] In manchen Studien wurde zudem die *RAD51*-Expression als Surrogatmarker für die Chemotherapie- und Strahlentherapieresistenz bestimmt. Hierbei wurde eine hohe Expressionsrate von *RAD51* mit einer hohen Reparaturkapazität der Tumorzellen gleichgesetzt. [263]

RAD51 hat fünf paraloge Gene: *RAD51B*, *RAD51C*, *XRCC2*, *XRCC3* und *DMC1*. [264-267] Mehrere Studien assoziieren *RAD51* und mehrere dieser Paralogen mit der Entwicklung und Resistenzentstehung bestimmter Tumore. Hierbei handelt es sich unter anderem um Brustkrebs [268-270], nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome [271, 272], Zervixkarzinome [273], Hautkrebs [274, 275] oder auch Prostatakarzinome [276, 277]. Für ein tieferes Verständnis der Funktionsweisen von *RAD51* und seiner paralogen Gene wurden die Interaktionen weiter untersucht. So gibt es beispielsweise Hinweise, dass *XRCC3* direkt mit *RAD51* interagiert. Hierbei zeigte sich, dass *XRCC3* bei der Formation von Reparaturkomplexen involviert ist und so die homologe Rekombination mit ermöglicht. [278-280]

Wie zuvor erwähnt, gibt es auch Veränderungen der Expressionsraten von *RAD51* und den paralogen Genen in höhergradigen Astrozytomen und auch Glioblastomen. [232, 233, 243] So zeigte sich beispielsweise nach Chemotherapie ein signifikanter Rückgang der DNA-Reparatur durch einen Knockdown von *RAD51* [233, 234] oder *XRCC3* [251]. Hierdurch konnte eine erhöhte Therapiesensitivität erreicht werden. [233, 234, 251] In Versuchen an Mäusen wurden *antisense* bindende Oligonukleotide (ODN) eingesetzt, um *RAD51* in Glioblastomzellen zu inhibieren. Dies hatte zur Folge, dass die Tumorzellen sensitiver auf die Strahlentherapie reagierten. Die Inhibition von *RAD51* führte somit unter anderem zu einem verlängerten Überleben der Tiere, im Vergleich zur Kontrollgruppe. [281, 282]

Dieser kurze Ausschnitt über die Rolle von *RAD51* und seinen Paralogen zeigt, dass dieses DNA-Reparaturgen vermutlich vor allem im Rahmen der Resistenzentstehung von Glioblastomen gegenüber der Chemo- und Strahlentherapie eine Rolle spielt. Die weitere

Untersuchung und Charakterisierung von *RAD51* könnte somit helfen, eine langfristig verbesserte Therapieeffizienz im Rahmen der Glioblastombehandlung zu erreichen.

4.1.2 Bedeutung der lncRNA *RAD51-AS1* und ihrer genomischen Lage zu *RAD51*

Eine Grundlage für die Fragestellung nach einer möglichen Wechselwirkung zwischen *RAD51* und *RAD51-AS1* ist die *antisense* Lage der beiden Gene. Mittlerweile gibt es Studien über verschiedene *antisense* liegende lncRNAs und ihre mögliche Rolle in der Pathogenese von Glioblastomen. So haben Untersuchungen der lncRNA *HMMR-AS1* ergeben, dass die Expression in Glioblastomzelllinien stark erhöht ist. *HMMR-AS1* liegt *antisense* zu dem *HMMR* (*Hyaluronan-Mediated Motility Receptor*) -Gen. Als Proto-Onkogen zeigt auch *HMMR* in Glioblastomen und in verschiedenen anderen Tumoren eine erhöhte Expression. [283-285] *HMMR* hat dabei vermutlich Einfluss auf die Glioblastomstammzellen, in dem *HMMR* deren selbstständige Erneuerung und somit auch das Tumorwachstum fördert. [236] Ein Knockdown der *antisense* liegenden lncRNA *HMMR-AS1* führte zu einer verminderten Expression von *HMMR* [238]. Weiterhin kam es nach dem Knockdown zu einer Inhibierung der Tumorzellmigration und -invasion und außerdem zu einer Reduktion des Wachstums von Glioblastomzellen. Zudem wurde nach dem Knockdown eine verstärkte Sensitivität gegenüber der Strahlentherapie entdeckt. Dieser Aspekt basiert vermutlich auf einer möglichen Interaktion mit DNA-Reparaturgenen, wie beispielsweise auch mit *RAD51*. [238]

Eine weitere lncRNA, die in Glioblastomzellen häufig sehr hoch exprimiert wird, ist die lncRNA *HOTAIRM1*, welche vermutlich stimulierenden Einfluss auf das Onkogen *HOXA1* hat. Eine hohe Expression von *HOTAIRM1* geht oft mit einer schlechteren Prognose für die Glioblastompatienten einher. Ein Knockdown der lncRNA konnte wiederum zu einer verminderten Tumorzellproliferation, -migration und -invasion führen. [286] Das Onkogen *HOXA1* gehört dabei zu dem sogenannten *HOXA gene cluster*, bestehend aus *HOXA1-HOXA11* und *HOXA13*. [287] Die *HOXA*-Gene spielen eine große Rolle in der embryonalen Entwicklung, bei der Homöostase von Gewebe und weiteren zellphysiologischen Abläufen. Mutationen in diesem Bereich können im Rahmen der embryonalen Entwicklung letal enden und stehen zusätzlich im Zusammenhang mit der Tumorentstehung. [288] Eine lncRNA, die vermutlich auf *HOXA11* Einfluss nimmt, ist die *antisense* liegende lncRNA *HOXA11-AS*. Es gibt Hinweise, dass eine hohe *HOXA11-AS*-Expression im Zusammenhang mit einem kürzeren Überleben der Glioblastompatienten steht. In Mäusen wurde außerdem eine

Korrelation von hohen *HOXA11-AS*-Expressionsraten und einer stärkeren Tumorprogression entdeckt. Grund hierfür könnte eine mögliche Interaktion von *HOXA11-AS* mit den Checkpoint- Inhibitoren p16, p21 und p27 und einer nachfolgenden Dysregulation des Zellzyklus sein. Hohe *HOXA11-AS*-Expressionen könnten somit in Zukunft möglicherweise eine Art prognostischer Biomarker für Glioblastompatienten darstellen. [289, 290] Eine weitere lncRNA die mit dem *HOXA gene cluster* interagiert ist die *antisense* liegende lncRNA *HOTTIP*. Eine Überexpression dieser lncRNA wurde in Glioblastomzellen mit einer verminderten Zellproliferation und einer apoptosestimulierenden Wirkung in Verbindung gebracht. [291] Diese *antisense* liegenden lncRNAs sind nur einige wenige Beispiele für den Einfluss von lncRNAs in Glioblastomen. lncRNAs können somit eventuell Prognose-assoziiierend und Bestandteil neuer Biomarker oder Therapieformen sein.

In der vorliegenden Arbeit sollte die *antisense* zu *RAD51* liegende lncRNA *RAD51-ASI* näher beleuchtet werden, um einen möglichen Zusammenhang in der Expression dieser Kopf-an-Kopf liegenden Genen zu untersuchen. Eine Fragestellung dieser Dissertation war, ob die lncRNA *RAD51-ASI* möglicherweise die Expression des DNA-Reparaturgens *RAD51* auf mRNA-Ebene reguliert. Diese Hypothese wurde im Verlauf auch von anderen Forschungsgruppen, für weitere Karzinomarten, verfolgt. Hierbei stellte sich raus, dass die Expression der beiden Gene möglicherweise von einem bidirektionalen Promotor gesteuert wird. [292] Durch Bindung von E2F1 an diesen Promotor kommt es zu einer verstärkten Expression von *RAD51* und einer verminderten Expression von *RAD51-ASI*. [293-295] Die Transkriptionsfaktoren der E2F Familie, bestehend aus E2F1-7, spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus. [296, 297] Im Rahmen der Studien zu *RAD51* und *RAD51-ASI* zeigte sich eine Überexpression von E2F1 in Mammakarzinom-Zelllinien, welche zu einer stark erhöhten Expression von *RAD51* und einer bis zu 80 % verminderten Expression von *RAD51-ASI* führte. [292] Zusätzlich wurde in Ovarialkarzinom-Zelllinien eine direkte Regulation von *RAD51-ASI* durch E2F1 entdeckt. In den Ovarialkarzinomen wurde zudem eine Assoziation der *RAD51-ASI*-Expressionsraten und dem medianen Überleben der Patienten festgestellt. Hohe Expressionsraten von *RAD51-ASI* gingen bei den Ovarialkarzinompatienten mit einer kürzeren Überlebenszeit einher. Eine mögliche Ursache könnte die in *in vitro* Versuchen gezeigten gesteigerten Proliferationsrate sein. Weiterhin konnte ein Knockdown von *RAD51-ASI* zu einer gesteigerten Apoptoserate und einer verminderten Migration und Invasion der Ovarialkarzinomzellen führen. *In*

vivo wurde zusätzlich ein verlangsamtes Tumorwachstum der Ovarialkarzinome nach *RAD51-AS1*-Knockdown festgestellt. In der Studie zu Ovarialkarzinomen wurde allerdings keine Verbindung zwischen der *RAD51-AS1*- und *RAD51*-Expression nachgewiesen. Man vermutete hier stattdessen eine Wechselwirkung von *RAD51-AS1* und p53. [298]

4.1.3 Expressionsanalysen der lncRNA *RAD51-AS1* und *RAD51* in Gliomzellen und Glioblastomen

Der erste Teil dieser Dissertation sollte einen möglichen Zusammenhang in der Expression von *RAD51-AS1* und *RAD51* auf Transkriptebene untersuchen. Hierfür wurde zunächst versucht, die Ergebnisse einer Mikroarray-Expressionsanalysen in Bezug auf zwischen TMZ-sensitiven und -resistenten Glioblastomzelllinien differentiell exprimierten lncRNAs mittels Echtzeit-RT-PCR zu validieren. Hierzu wurden die Expressionsraten von *RAD51-AS1* und *RAD51* in den drei parental (TMZ-sensitiven) und zugehörigen TMZ-resistenten Glioblastomzelllinien LNT229, LN308 und LN18 untersucht. Zusätzlich wurden die Expressionsraten beider Gene in späteren Passagen der parental und TMZ-resistenten Zelllinien von LNT229 und LN18 bestimmt. Im Rahmen der durchgeführten Analysen konnte allerdings kein signifikanter Unterschied der *RAD51-AS1*-Expression zwischen parental und TMZ-resistenten Glioblastomzelllinien nachgewiesen werden. Weitergehend wurden noch Proben von Glioblastompatienten auf die Expression von *RAD51-AS1* untersucht. Hierbei handelte es sich um je eine Primärtumor- und eine Rezidivtumorprobe (nach Behandlung mit TMZ) von sechs Glioblastompatienten. Nur in zwei der sechs Proben zeigte sich eine eindeutige Erhöhung der *RAD51-AS1*-Expression in der parental Primärtumorprobe (siehe 3.1.4). Zusammenfassend konnte weder in parental Glioblastomzelllinien noch in den unbehandelten Primärtumorproben von Glioblastompatienten eine signifikant erhöhte *RAD51-AS1*-Expression im Vergleich zu TMZ-behandelten Zelllinien bzw. Tumorgewebeproben bestätigt werden.

Zusätzlich sollte im Rahmen der Arbeitshypothese die erhöhte *RAD51*-Expression in resistenten Glioblastomzellen überprüft werden. Hierbei konnte lediglich in der LN18 Zelllinie eine signifikante Erhöhung von *RAD51* in den TMZ-resistenten im Vergleich zu den parental Glioblastomzellen nachgewiesen werden (siehe 3.1.2). In den Proben der sechs Glioblastompatienten zeigten vier der sechs Proben eine Erhöhung der *RAD51*-Expression in den Rezidivtumorproben nach TMZ-Behandlung (siehe 3.1.4).

Aufgrund der fehlenden Signifikanz der Ergebnisse wurde die differentielle Expression weiterer, von Hapold *et al.* [244] beschriebener, Gene untersucht. Hierbei wurden die Expressionsraten von *MGMT*, *p21* und *MSH6* in den parentalen und resistenten Zelllinien LNT229, LN308 und LN18 getestet. Die nach Hapold *et al.* [244] zu erwartenden Expressionsunterschiede von *MGMT* und *p21* konnten in der Zelllinie LN18 mit signifikanten Unterschieden bestätigt werden. Für *MSH6* ergab sich in LNT229 eine niedrigere Expression in TMZ-resistenten versus parentalen Zellen, die aber nicht signifikant unterschiedlich war. Es zeigten sich zudem Unterschiede zwischen den Expressionsraten von *MGMT*, *p21* und *MSH6* in den Screening- und Validierungsproben (siehe Abb.6). Diese Unterschiede können eventuell dadurch bedingt sein, dass die resistenten Zelllinien der Screeningproben nicht konsequent mit TMZ weiter behandelt wurden, so dass der Resistenzphänotyp dieser Zellen nicht mehr so stark ausgeprägt war, wie zu den Zeitpunkten als die Voruntersuchungen und die Mikroarray-Expressionsanalysen stattgefunden haben. [244] Zur Überprüfung dieser These müssten die Zellen der Passage, mit denen die eigenen Analysen stattgefunden haben, noch einmal untersucht und der IC₅₀-Wert für TMZ bestimmt werden. Außerdem könnte man versuchen, mehr Patientenproben von Primär- und Rezidivtumoren vergleichend zu untersuchen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bisher in keiner weiteren Studie, außer in den vorliegenden Mikroarrayanalysen, eine Hochregulation von *RAD51-AS1* in Glioblastomzelllinien festgestellt und beschrieben wurde. Die Arbeitshypothese war aufgrund der Kopf-an-Kopf Lage von *RAD51-AS1* und der schon bekannten, wichtigen Bedeutung von *RAD51* in Glioblastomen und anderen Tumoren sehr interessant. Allerdings fand sich in den eigenen Expressionsanalysen keine wirklich überzeugende Evidenz dafür, diese Hypothese unbedingt weiter zu verfolgen, zumal der Knockdown von *RAD51-AS1* sich im weiteren Verlauf dieser Arbeit als schwierig gestaltete (s.u).

Unabhängig vom möglichen Zusammenhang zwischen der lncRNA *RAD51-AS1* und *RAD51* erscheint eine Fokussierung auf *RAD51* und die Rolle dieses DNA-Reparaturgens in Glioblastomen sinnvoll. Die erhöhte Expression von *RAD51* in den TMZ-resistenten Glioblastomzelllinien und in den Tumorproben nach TMZ-Therapie konnte auch in dieser Arbeit, teilweise signifikant, bestätigt werden. Eine stetige Erweiterung des Wissens rund um die TMZ-Resistenz von Glioblastomen ist bedeutend für die zukünftige Ausweitung und Verbesserung der Therapiemöglichkeiten. So zeigten, wie schon zuvor erwähnt, erste *in vivo* Versuche einen erhöhte Strahlentherapiesensitivität nach Knockdown von

RAD51. [281, 282] Zusätzlich könnte *RAD51* eventuell auch als Biomarker bei Glioblastompatienten genutzt werden. Die Bestimmung der Expressionsraten von *RAD51* könnte zu gezielteren prognostischen Aussagen für die jeweiligen Patienten führen. Zur weiteren Validierung sollte eine Korrelation der Expressions- und Ansprechraten auf die Chemo- und Strahlentherapie in größer angelegten Studien untersucht werden. Das Potential von *RAD51* als potentiellen Biomarker zeigen die Ergebnisse zu *RAD51* bei Brustkrebspatientinnen. Hier gehört die Bestimmung von *RAD51* bei Verdacht auf familiären Brustkrebspatienten mittlerweile zum Standard. [299]

4.2 Funktion und Bedeutung von siRNAs

Small interfering RNAs, kurz siRNAs, beschreiben doppel- oder einzelsträngige RNAs, welche zwischen 19-28 Basenpaaren lang sind. Strukturell besitzen sie am 5'-Ende meist eine Phosphatgruppe, am 3'-Ende eine Hydroxylgruppe und einen Dinukleotidüberhang. [300] *Interfering* bedeutet dabei soviel wie „stören“ und der Prozess wird auch als RNAi (*RNA interference*) bezeichnet. Hierbei kann sich die RNA an eine bestimmte Ziel-RNA anlagern und zur Degradierung dieser führen. Diese Art der posttranskriptionellen Modifikation kann durch Anlagerung von siRNAs oder miRNAs ausgeführt werden. [301] SiRNAs entstehen durch eine Spaltung von doppelsträngigen RNAs durch die RNase III (Ribonuklease III), auch *Dicer* genannt. Die siRNAs können anschließend an einen Multiproteinkomplex namens RISC (*RNA induced silencing complex*) binden. Es kommt zu einer Abspaltung des Passagierstrangs vom Leitstrang der siRNA. Der Leitstrang bindet dann an die jeweilige Ziel-RNA. Eine Spaltung der Ziel-RNA erfolgt anschließend durch ein Zusammenspiel von RISC, TRBP (*Trans-activation-responsive RNA-binding protein*) und Ago 2 (*Argonaute 2*) (Abb. 26). [300, 302-307]

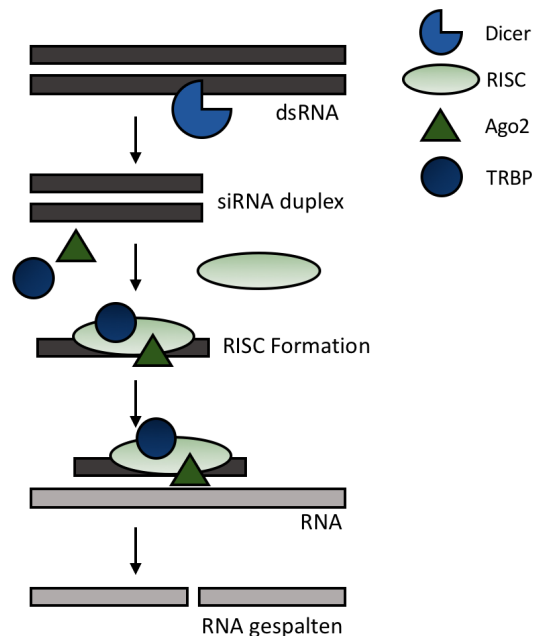


Abbildung 26: Mechanismus der RNA-Spaltung durch siRNAs. (Modifiziert nach IDT, RNAi and DsiRNA: Pathway, mechanism and design) Man erkennt die Abfolge der RNA-Spaltung durch eine siRNA im Komplex mit RISC, TRBP und Ago2.

Über diesen Mechanismus ist RNAi in viele Prozesse involviert. Hierbei handelt es sich beispielsweise um Zellproliferation und -wachstum, Gewebedifferenzierung oder auch strukturelle Formationen von Heterochromatin. Zusammen mit anderen kleinen regulatorischen RNAs wie piRNAs oder miRNAs, sind siRNAs fester Bestandteil zellulärer Regulationsprozesse. [301, 308, 309] Sie sind außerdem an der zellulären Abwehr gegen RNA-Viren beteiligt oder können beispielsweise die Zellen vor Transposon-Einbau beschützen. [310-313] Aufgrund dieser vielfältigen Eigenschaften hat man angefangen, siRNAs auch synthetisch herzustellen. Diese Möglichkeit führte zu einem großen Fortschritt in der Wissenschaft und synthetisch hergestellte siRNAs werden heutzutage vielfältig genutzt. [314-316] Die gezielte Inhibition bestimmter Genexpressionen und die antiviralen Therapiemöglichkeiten sind Bestandteil aktueller Forschungen, *in vitro* und *in vivo*. [317, 318] Die ersten Versuche in diese Richtung wurden schon vor etwa 40 Jahren durchgeführt und bis heute ist die Thematik sehr spannend, denn das Wissen rund um RNAi wird stetig erweitert. [319, 320] Aufgrund des großen Potentials für weitere Forschungen und der Möglichkeit zur Entwicklung zielgerichteter Therapieformen wurden Andrew Z. Fire und Craig C. Mello für die Entdeckung und Untersuchung der RNAi-Mechanismen im Jahr 2006 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. [313, 321]

4.2.1 Differenzierung zwischen einzelnen siRNAs und siRNA-Pools

Für die Anwendung von siRNAs stehen derzeit verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Im Rahmen des zweiten Teils dieser Arbeit wurden zum einen zwei verschiedene Kits für einzelne siRNAs verwendet und zum anderen siRNA-Pools. Einzelne (single) siRNAs, beinhalten dabei eine siRNA, die beispielsweise 21 (Qiagen) oder 27 (Trifecta) Nukleotide lang ist. Diese siRNA wird speziell für den Knockdown eines bestimmten Genprodukts entworfen. Hierbei bindet die siRNA sequenzspezifisch an die jeweilige RNA und spaltet sie. Hierdurch kommt es zu einer Verminderung des jeweiligen Genprodukts, welches je nach Zielgen verschiedene Auswirkungen im zellulären Ablauf hervorrufen kann. Diese Einsatzmöglichkeit von siRNAs galt eine Zeit lang als Revolution für neue Ansätze zielgerichteter Therapiemöglichkeiten. Allerdings stellte sich mit der Zeit heraus, dass neben der Reduktion der Ziel-RNA noch andere Effekte auftreten. [322, 323] Die Hintergründe für diese sogenannten *off-target*-Effekte sind noch nicht vollständig geklärt. Es gibt jedoch verschiedene Ansätze, um die zellulären Veränderungen nach einer siRNA-Transfektion zu erklären. So stellte sich in

verschiedenen Studien heraus, dass siRNAs neben der Ziel-RNA auch an andere RNAs binden können. Hierzu müssen die RNAs nicht gänzlich komplementär zu der siRNA sein, selbst bei einer Differenz von bis zu neun Nukleotiden konnten Bindungen zwischen der siRNA und diversen RNAs nachgewiesen werden. [324] Diese ungewollten Effekte durch die zusätzliche Bindung konnten anhand von Mikroarrayanalysen bestätigt werden. [322] Zusätzlich lassen sich die *off-target*-Effekte eventuell auch durch einen Vergleich zu der Wirkungsweise von miRNAs erklären. Grund dafür ist, dass neben siRNAs auch miRNAs in die posttranskriptionelle Genregulation eingreifen können. Nach vorheriger Spaltung durch *Dicer* und Bindung an das miRNP (*microRNA ribonucleoprotein*), welches dem RISC sehr ähnelt, können die miRNAs ebenfalls an RNAs binden. Bei gänzlich komplementärer Bindung an die RNA kann diese anschließend gespalten werden. Wenn die jeweilige miRNA nur an manchen Stellen komplementär an die RNA binden kann, reicht dies dennoch für eine Hemmung der Translation aus. [325] Diese sogenannten *Seeds*, über die die miRNA an die RNA binden kann, bestehen lediglich aus sechs bis sieben Nukleotiden. [326, 327] Eine ähnliche Hemmung der Translation, bei nicht vollständiger Bindung, könnte auch ein Grund für Nebeneffekte bei siRNA gesteuerten Vorgängen sein. [328, 329] Hierbei könnten die *Seed*-Regionen von siRNAs ebenfalls an tausende RNAs binden, was eine Erklärung für die zahlreichen, unkontrollierbaren *off-target*-Effekte sein könnte. [322, 323, 330, 331] Hierbei ist wichtig zu erwähnen, dass die *off-target*-Effekte, abhängig von der jeweiligen siRNA, stark variieren. [323]

Weiterhin wurde festgestellt, dass die siRNAs ab einer bestimmten Konzentration generell auf die zellulären Abläufe Einfluss haben. Hohe Konzentrationen der siRNAs lösten unter anderem Signalwege aus, die mit einer Stressantwort und auch Apoptose in Verbindung gebracht werden. [332-334] Ein möglicher Ansatz, um diesen Aspekt der *off-target*-Effekte weitestgehend zu umgehen, ist der Einsatz von siRNA-Pools, in diesem Fall mittels siPOOL™ (Biotech). Hierbei handelt es sich um eine Zusammenführung von 30 verschiedenen einzelnen siRNAs, welche unterschiedliche Oligonukleotide beinhalten, aber an derselben Ziel-RNA binden (Abb. 27). [330] Hierdurch ist es möglich jede einzelne siRNA in geringerer Konzentration zu verwenden. Einzelne (single) siRNAs werden mit Konzentrationen im Nanomolar-Bereich eingesetzt, siRNA-Pools hingegen im Picomolar-Bereich (siehe siPOOLS™ Biotech). Diese Konzentrationsminderung kann die Stressantwort der behandelten Zellen minimieren. [330-332] Zusätzlich steigt durch den Einsatz von 30 einzelnen siRNAs die

Wahrscheinlichkeit, dass ein Großteil von ihnen an der gleichen RNA bindet und so die Genexpression gezielter reguliert werden kann. [330]

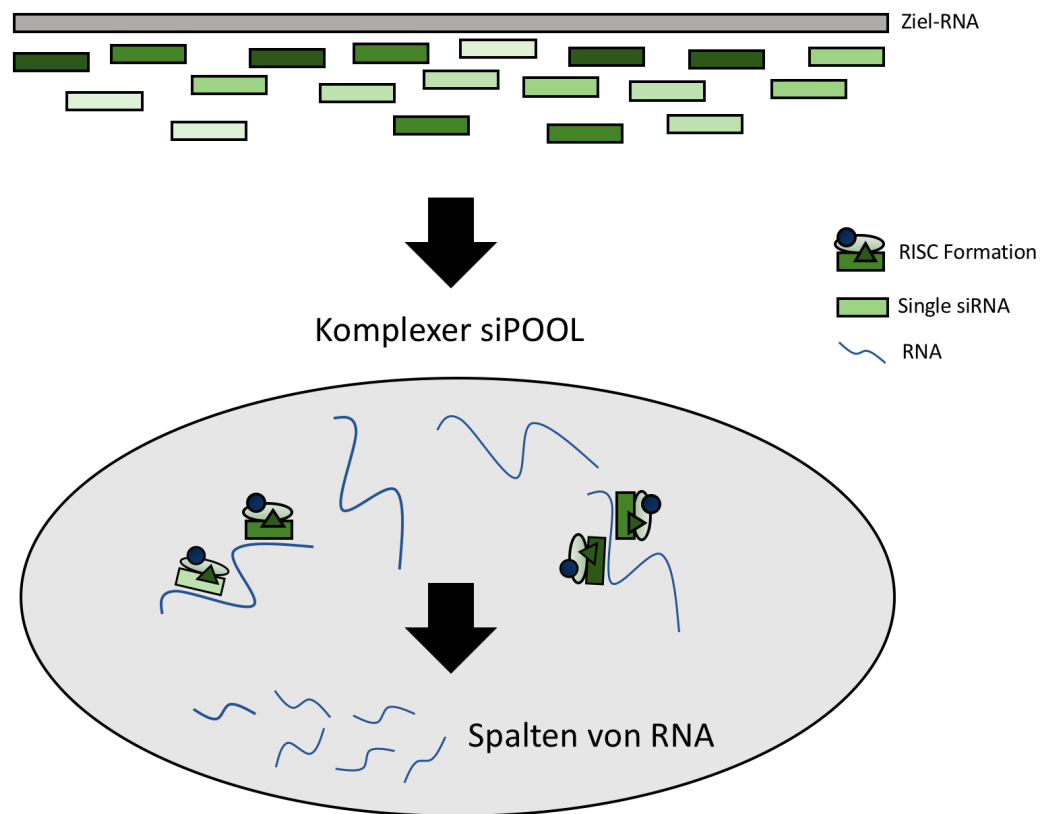


Abbildung 27: Mechanismus der RNA-Spaltung durch siRNA-Pools. (Modifiziert nach siTOOLS™ Biotech, “How it works”) Man erkennt vereinfacht den Mechanismus der RNA Spaltung durch siRNA-Pools im Komplex der RISC Formation.

Für diese Arbeit wurden insgesamt drei verschiedene Kits verwendet, um zunächst einen Knockdown der lncRNA *RAD51-AS1* zu etablieren. Hierbei wurden zwei single siRNA Kits verschiedener Anbieter (FlexiTube GeneSolution siRNA; Qiagen GmbH/TriFEcTa™ Dicer-Substrate RNAi Kit; IDT) und ein siPOOL™ (siTOOLS Biotech) verwendet. Keine der verwendeten vier einzelnen (single) siRNAs des FlexiTube GeneSolution siRNA Kits (Qiagen) konnte eine Herunterregulation von *RAD51-AS1* von über 50 % erreichen (siehe 3.2.1.1). Nach Herstellerangaben sollte ein Knockdown von mindestens 70 % erreicht werden können. [335] In dem zweiten verwendeten Kit, TriFEcTa™ Dicer-Substrate RNAi (IDT), wurde die Anzahl der siRNA-Nukleotide von 21 auf 27 erhöht, um eine höhere Spezifität zu erreichen. [336] In diesem Versuchsansatz

konnte in den Zellen der U251MG Glioblastomzelllinie durch eine der drei verwendeten einzelnen (single) siRNAs ein Knockdown von über 50 % erreicht werden (siehe 3.2.1.2). Lediglich in dieser Zelllinie konnte auch das Herstellerversprechen von über 90 % Knockdown der *HPRT*-Positivkontrolle nachgewiesen werden. In T98G Glioblastomzellen wiederum konnten weder die Expression von *RAD51-AS1* noch die Positivkontrolle in diesem Maße herunterreguliert werden. Als weitere Kontrolle wurde mit diesem Kit eine Messung der Transfektionseffizienz, mittels Fluoreszenzfarbstoff TYE 563, durchgeführt. Hierbei war in beiden Zelllinien eine Transfektionseffizienz der Zellen von über 90 % nachzuweisen (siehe 3.2.1.2, Abb. 10). Dies entsprach den Erwartungen des Herstellers. [336] Die doppelte Kontrollmöglichkeit kann die Auswertung des Kits stark vereinfachen und eine mögliche Fehlersuche unterstützen. Auffällig bei dieser Untersuchung war, dass auch in den Zellen, die lediglich mit der *HPRT*-Positivkontrolle transfiziert worden waren, eine Veränderung der *RAD51-AS1*-Expression nachzuweisen war. Möglicherweise ist dies eine der Auswirkungen von *off-target*-Effekten. Die Ergebnisse in 3.2.1.2 wurden nach 24 h Inkubationszeit generiert. Es wurde zusätzlich auch RNA 48 h nach siRNA-Transfektion extrahiert, hierbei zeigte sich im Vergleich keine Veränderung der Expressionsraten.

In dem dritten Ansatz wurden U251MG und T98G Zellen mit einem siPOOL™ gegen *RAD51-AS1* transfiziert. Durch Variation verschiedener Parameter wie Zellzahl/Well, Konzentration des siPOOL™, Einsatz verschiedener Transfektionsreagenzien und die Variation der Extraktionszeit war ein Knockdown von etwas über 50 % zu erreichen.

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden ebenfalls mittels siPOOL™ durchgeführt. So wurde für den dritten Teil dieser Arbeit eine der überlebenszeitassoziierten lncRNAs, *AL109615.3*, ebenfalls mit einem siPOOL™ herunterreguliert, um anschließend weitere funktionelle Analysen durchzuführen. Im Gegensatz zum Knockdown von *RAD51-AS1* zeigte der Knockdown von *AL109615.3* mittels siPOOL™ eine starke Effizienz. In drei unabhängigen Versuchen war jedes Mal ein Knockdown von *AL109615.3* von über 90 % zu erzielen (siehe 3.4.1).

Diese großen Effizienzunterschiede lassen sich möglicherweise mit den unterschiedlichen zellulären Lokalisationen der beiden lncRNAs erklären. lncRNAs können vorwiegend im Nukleus, im Zytoplasma, in beiden Kompartimenten oder auch in anderen zellulären Kompartimenten vorkommen. Für *RAD51-AS1* wurde für diese Arbeit keine Bestimmung der intrazellulären Lokalisation durchgeführt. Es wurde allerdings von

anderen Autoren herausgefunden, dass *RAD51-ASI* vermehrt im Nukleus lokalisiert ist. [298] Die lncRNA *AL109615.3* wurde im Rahmen dieser Arbeit auf ihre zelluläre Lokalisation untersucht und es zeigte sich, dass sie vorwiegend im Zytoplasma exprimiert wird (siehe 3.3.4). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Effizienz des Knockdowns stark von der zellulären Lokalisation des Zieltranskriptes abhängen kann. [248-250] So gibt es neben RNAi beispielsweise noch die Möglichkeit lncRNAs mittels ASO (*antisense oligonucleotides*) zu regulieren. Hierbei binden die ASO an die Ziel-RNA und anschließend kommt es im Komplex mit der RNase H1 zu einer Spaltung der Ziel-RNA. [249, 337] Da die RNase H1 vor allem im Nukleus vorkommt, ist diese Methode dort sehr effizient. [249, 338] SiRNAs wiederum wirken vor allem im Zytoplasma und haben weniger Einfluss auf die Konzentrationen von lncRNAs im Nukleus. [248, 250] Bei einem Vergleich der beiden Methoden zeigte sich, dass für einen Knockdown von lncRNAs, bei denen man die Lokalisation nicht kennt, die Nutzung der ASO-Methode eine größere Effizienz aufweist. [339] Einen weiteren Ansatz um einen effizienten lncRNA-Knockdown zu generieren, könnte die CRISPR/Cas9-Methode darstellen. Hierbei handelt es sich um eine Methode, bei der doppelsträngige DNA-Brüche initiiert werden. Dies geschieht im Zusammenspiel von einer zielspezifischen crRNA (*CRISPR-RNA*), welche an eine tracrRNA (*Trans-activating crRNA*) hybridisiert ist und einen Komplex mit dem Cas9-Protein bildet. In diesem Komplex wird das bakterielle Endonuklease-Enzym durch eine ortsspezifische Leit-RNA an eine gewünschte Stelle im Genom gelenkt und führt zu Doppelstrangbrüchen und somit zu einer Eliminierung der lncRNA auf genomischer Ebene. [339, 340] Weitere Versuche zum Knockdown von *RAD51-ASI* sollten also gegebenenfalls mittels ASO-Methode durchgeführt und validiert werden, da diese sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma einen effizienten Knockdown generieren kann. [248, 338] Alternativ könnte ein Ansatz über die CRISPR/Cas9-Methode vielversprechend sein. [339]

Bei der Etablierung von möglichen Methoden zum Knockdown von lncRNAs konnte diese Arbeit zeigen, dass eine vorherige Bestimmung der intrazellulären Lokalisation der jeweiligen lncRNA sehr bedeutend für die Ergebnisse sein kann. Es zeigte sich zusätzlich, dass die Herstellerangaben zum erwarteten Knockdown des Zielgens offensichtlich nicht für alle lncRNAs eingehalten werden können. Bei der Optimierung des Knockdowns mittels einzelner siRNAs haben die Hersteller die Gene *HPRT*, *SSB*, *STAT1*, *HNRPH1*, *MALAT1* und *NEAT1* getestet. [341-343] *HPRT* und *STAT1* kommen vorwiegend im Zytoplasma vor. *HNRPH1*, *SSB*, *MALAT1* und *NEAT1* hingegen kommen sowohl im

Nukleus als auch im Zytoplasma vor. [344-349] In diesem Kontext ist es schwierig eine Aussage über die Effizienz und Effekte der Nutzung von einzelnen (single) siRNAs im Vergleich zu siRNA-Pools zu treffen. Die geringe Effizienz des Knockdowns von *RAD51-AS1* mittels einzelner (single) siRNAs könnte folglich auch aufgrund der vorwiegend nukleären Lage von *RAD51-AS1* zustande gekommen sein. Für einen direkten Vergleich könnte man zusätzlich auch einzelne siRNAs für den Knockdown der vorwiegend zytoplasmatisch vorkommenden lncRNA *AL109615.3* testen.

Es gibt zudem noch weitere Hersteller welche siRNA-Pools anbieten, bei denen an verschiedenen Stellen Modifikationen durchgeführt worden sind (beispielsweise SMARTpool siRNA, ON-TARGET_{plus} siRNA; horizonTM). Neben der Verminderung der siRNA-Konzentration durch das Pooling wurden weiterhin noch sogenannte Schlüssel-Nukleotide auf dem *sense* und *antisense* Strang entdeckt und modifiziert. In diesem Zusammenhang sollen bis zu 80 % weniger *off-target*-Effekte auftreten. [350] Für einen effizienten Knockdown und einen guten Vergleich zwischen den verschiedenen Methoden könnte man somit auch dieses Kit testen, um mögliche Differenzen aufzudecken. In diesem Rahmen könnte man anschließend ebenfalls funktionelle Analysen durchführen und die Ergebnisse vergleichen, um den Einfluss möglicher *off-target*-Effekte abhängig vom jeweiligen Kit weiter zu untersuchen.

4.2.2 Einsatz von siRNA gesteuertem Knockdown *in vitro* und *in vivo*

Der Einsatz von RNAi ist schon seit vielen Jahren Bestandteil der Forschung und eine gängige Methode für den Knockdown der Expression bestimmter Gene *in vitro*. [351] Die bislang als „nicht therapierbar“ betitelten Gene schienen mittels RNAi erreichbar. [314, 352] Jedoch wurde der anfängliche Enthusiasmus neue, hoch effiziente, wandelbare und zielgerichtete Therapiemöglichkeiten gegen verschiedene Erkrankungen, virale Infektionen und auch Krebsleiden gefunden zu haben, recht bald gedämpft. *In vitro* Methoden auf die Bedingungen *in vivo* zu übertragen ist eine herausfordernde Aufgabe, da hierfür verschiedene Komplikationen überwunden werden müssen. [313, 353] So ist es beispielsweise wichtig sämtliche Störfaktoren einzudämmen. Hierzu zählen zum einen die *off-target*-Effekte, aber auch Zytotoxizität und zelluläre Immunantworten auf die Therapie. [351, 353-355] Zum anderen gibt es Hindernisse bei dem gezielten Transport zu dem jeweiligen Zielorgan oder -gewebe. Hierbei wurden beispielsweise Ansätze mittels Liposomen, Nanopartikel, Liganden wie Peptide oder Antikörper, virale Vektoren, dendritische Zellen oder auch freien Transport getestet. [317, 356-363] Es

müssen stabile Therapieformen etabliert werden, die eine hohe Bioverfügbarkeit aufweisen und effizient die Zielregionen regulieren können. [313, 353, 360] Systemische Injektionen sind oft gescheitert, da meist eine schnelle renale und hepatische Elimination stattfindet. [352, 364] Es konnten allerdings einige klinische Studien an Augen durchgeführt werden, die viele dieser Aspekte, durch eine gezielte Injektion in das Zielgewebe, umgehen konnten. [365] Ähnlich erfolgreich war ein kürzlich etabliertes Konzept zur Behandlung von Lungenerkrankungen, bei dem die siRNA mittels Inhalation an den Zielort gebracht werden konnte. [366]

Ein wichtiger Aspekt bei der komplizierten Anwendung von siRNAs *in vivo* ist außerdem der Mechanismus des Körpers, sämtliche fremde RNA gezielt und zeitig zu bekämpfen, um den Körper vor möglichen Krankheiten zu schützen. [351, 354, 367-369] Damit dies nicht geschieht müssen verschiedene, unter anderem chemische, Modifikationen durchgeführt werden, um in Zukunft die vollen Fähigkeiten der RNAi nutzen zu können. [369, 370] Weiterhin gibt es die Möglichkeit einer Bindung von siRNAs an sogenannte Biokonjugate wie lipophile Moleküle, Liganden, Peptide, Polymere, Antikörper oder Aptamere. [353, 355, 359] Dies erscheint derzeit von allen Möglichkeiten, die siRNA zu dem Zielgen zu leiten, die effektivste, da die Biokonjugate unter anderem weniger toxisch sind und vom Immunsystem aufgrund ihrer kleinen Größe häufig nicht erkannt werden. [355, 359, 371]

Ausblickend sind, für ein ganzheitliches Verständnis der zellulären Abläufe und Reaktionen im Rahmen der *in vivo* Anwendung von RNAi, noch weitere Forschungen notwendig. Die Möglichkeit via RNAi, ASO und CRISPR/Cas9 jedes mögliche Zielgen beeinflussen zu können, könnte in Zukunft ein Fundament darstellen, auf dem die weitere Forschung im Rahmen einer zielgerichteten Therapie aufbauen kann. [353, 362] Neben den vielfältigen Einsatzmöglichkeiten dieser Methoden, ist diese Form der Therapie zudem oftmals weniger toxisch im Vergleich zu einer Chemotherapie. [353, 355] Bislang sind schon mindestens 20 klinische Studien mittels miRNAs und siRNAs durchgeführt worden. [372] Hierbei handelt es sich beispielsweise um Studien im Rahmen der Transthyretin-Amyloidosen [373] Pankreaskarzinomen [374, 375], bei den adenoidzystische Karzinomen [376] und auch multiplen Myelomen und Non-Hodgkin Lymphomen. [377]

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Möglichkeit der zielgerichteten Therapie mittels RNAi in den letzten Jahren immer weiterentwickelt wurde und viele Forschungen sich auf dieses Thema konzentrieren. Die Hindernisse der *in vivo* Therapie wurden

vielseitig beleuchtet und teilweise Ansätze entwickelt, sie zu umgehen. Erste klinische Studien wurden durchgeführt und somit die Grundsteine für eine zielgerichtete, individuelle Therapie mittels RNAi gelegt.

4.3 Prognose-assoziierte lncRNAs

4.3.1 Auswahlprozess der Prognose-assoziierten lncRNAs

Für den dritten Teil dieser Arbeit wurden Prognose-assoziierte lncRNAs aus dem TANRIC-Datensatz ausgewählt, um in Glioblastomzelllinien bezüglich ihrer Expression, Proliferation, Vitalität und Apoptose näher charakterisiert zu werden. 12727 lncRNAs aus 154 Glioblastomproben wurden anhand verschiedener Kriterien gefiltert. Grundlegend war zunächst das Vorhandensein von Daten zu Überlebenszeitanalysen. Außerdem sollten die lncRNAs eine ähnliche Gruppengröße und eine statistisch relevante Assoziation ($p < 0,01$) mit einer schlechten Prognose aufweisen (siehe Abb. 13). Zwölf lncRNAs wurden mittels Endpunkt-PCR untersucht und für fünf Kandidaten konnten diese Methode etabliert werden. Für drei dieser fünf lncRNAs wurde zusätzlich die Echtzeit-RT-PCR etabliert und eine dieser drei wurde vermehrt im Zytoplasma exprimiert (siehe Abb. 18). Hierbei handelte es sich um die lncRNA *AL109615.3*, die nachfolgend in weiteren funktionellen Analysen näher charakterisiert wurde.

Die Auswahl der zwölf lncRNAs aus 97 möglichen Kandidaten (siehe Tabelle 8) wurde auf Basis zwei verschiedener Grundlagen getroffen. Zum einen wurden auf die medianen Expressionsraten der jeweiligen lncRNA in den Glioblastomproben geachtet. Die lncRNAs *AL807761.3*, *AC090617.5* und *AC099343.4* wiesen die drei höchsten medianen Expressionsraten auf. Zusätzlich zeigten die lncRNAs *AC145124.1* und *AC034243.1* ebenfalls sehr hohe mediane Expressionsraten. Neben dem Parameter einer hohen Expressionsrate war es interessant, lncRNAs zu wählen, bei denen Assoziationen zu Karzinomen gefunden werden konnten. Somit wurden die restlichen sieben lncRNAs aufgrund ihrer *antisense* Lagen zu schon bekannten und in der Literatur beschriebenen Genen ausgewählt. Hierbei handelt es sich um die lncRNAs *UBXN10-AS1*, *CPEB1-AS1*, *AC011899.2*, *AC068888.1*, *TMEM106A-AS1*, *AC055874.1* und *AL109615.3*. Die lncRNA *UBXN10-AS1* liegt dabei *antisense* zu *UBXN10* (*UBX domain protein 10*). *UBXN10* gehört zu der UBX-Familie und wird vor allem mit der Ziliogenese in Verbindung gebracht. [378] Störungen bei der Ziliogenese wurden wiederum im Rahmen der Pathogenese von Mamma-, Pankreas- und auch Nierenkarzinomen nachgewiesen. [379-381] Dies führte zu der Hypothese eines möglichen Zusammenhangs zwischen der jeweiligen Tumopathogenese und einer Fehlregulation von *UBXN10*. [382] Die lncRNA *CPEB1-AS1* wiederum liegt *antisense* zu *CPEB1*. Dies steht für das

cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1, welches mit Brustkrebsmetastasen sowie hepatozellulären Karzinomen assoziiert wurde. [383-385] Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass *CPEB1* in Glioblastomzellen herunterreguliert wird. Studien zeigten, dass eine gesteigerte *CPEB1* Expression zu einem verminderten Wachstum der Tumorzellen führt und so negativ mit dem Gesamtüberleben der Glioblastompatienten korreliert. [386, 387]

Neben *UBXN10* und *CPEB1* konnten auch die Rezeptoren *PTPRN2* und *RYR3*, sowie der Translationsfaktor *EIF4B* mit der Pathogenese von Mammakarzinomen assoziiert werden. Die lncRNA *AC011899.2* liegt dabei *antisense* zu dem *PTPRN2* (*Protein tyrosine phosphatase receptor type N2*), *AC068888.1* *antisense* zu dem *EIF4B* (*Eukaryotic translation initiation factor 4B*) und *AC055874.1* zu dem *RYR3* (Ryanodin Rezeptor 3). Ein Knockdown von *PTPRN2* oder *EIF4B* führte beispielsweise zu einer gesteigerten Apoptoserate in den Brustkrebszellen. [388, 389] Bei dem Knockdown von *EIF4B* kam es zusätzlich zu einem Proliferationsrückgang der Brustkrebszellen. Weiterhin wurde der Translationsfaktor mit einer Therapieresistenz gegenüber EGFR-Inhibitoren bei triple-negativen Mammakarzinomen in Verbindung gebracht. [389-391] Eine hohe Expression des Calciumrezeptors *RYR3* wurde ebenfalls mit dem Wachstum, der Migration und auch Morphologie von Brustkrebszellen verbunden. [392] Zusätzlich wurde kürzlich im Rahmen einer *two-gene signature* ein Einfluss von *GRIA2* (*glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2*) und *RYR3* auf die Proliferation, Invasion und Migration von Glioblastomzellen beschrieben. [393]

Eine weitere ausgewählte lncRNA, *TMEM106A-AS1*, liegt *antisense* zu *TMEM106A* (*transmembrane protein 106*). Hierbei handelt es sich eventuell um einen Tumorsuppressor, da gesteigerte Expressionsraten von *TMEM106A* in nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen mit einer gehemmten Migration und Proliferation und einer erhöhten Apoptoserate in Verbindung gebracht wurden. [394] Die weiterhin untersuchte lncRNA *AL109615.3* liegt *antisense* zu *C6ORF223* (*chromosome 6 open reading frame 223*). *C6ORF223* interagiert wahrscheinlich mit dem *hnRNPK* (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*), welches unter anderem mit p53 interagiert. Somit sind *hnRNPK* und eventuell auch *C6ORF223* möglicherweise in die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden involviert. *HnRNPK* kann zusätzlich als Transkriptionsaktivator und -repressor dienen. [395, 396] Zudem gibt es erste Hinweise, dass *hnRNPK* die Migration, Ausbreitung und Invasion von Glioblastomzellen verringern kann. [397]

Die beschriebenen zwölf Kandidaten-lncRNAs wurden somit aufgrund ihrer *antisense*

Lagen zu schon bekannten, tumorassoziierten Genen oder der hohen medianen Expression für weitere Analysen ausgewählt. Hierzu wurden zunächst Primer entworfen, um die Expression der jeweiligen lncRNAs in Glioblastomzelllinien und astrozytären Gliomen näher zu untersuchen.

4.3.2 Spleißvarianten bei lncRNAs

Für die Etablierung der Expressionsanalyse mittels Endpunkt-PCR wurden für die zwölf lncRNAs zunächst Primer mittels Primer3 Programm entworfen. Für die nachfolgend durchgeführten Endpunkt-PCRs wurde ein Set bestehend aus nicht-neoplastischem Hirngewebe, Glioblastomzelllinien und Glioblastomtumorproben verwendet. Hierbei fielen bei sieben der zwölf lncRNAs multiple oder fehlende Banden in der Endpunkt-PCR auf (siehe 3.3.2). Aufgrund dessen wurden für manche lncRNAs weitere Primer entworfen, um sie mittels Endpunkt PCR zu etablieren. Die neuen Primer und auch Kombinationen aus alten und neuen Primern konnten für sieben lncRNAs das Problem der multiplen und fehlenden Banden nicht lösen. Diese sieben lncRNAs wurden somit von weiteren Versuchen ausgeschlossen.

Eine mögliche Erklärung für die multiplen Banden könnte ein alternatives Spleißen der lncRNAs sein. Wie schon zuvor erwähnt, sind lncRNAs mit verschiedenen Merkmalen proteinkodierender RNAs assoziiert. Hierzu gehören unter anderem eine 5'-Kappe, ein 3'-Poly-A-Schwanz, mehrere Exone und eben auch alternatives Spleißen. [134, 135] Mehr als ein Viertel aller lncRNAs weisen Tendenzen für ein alternatives Spleißen auf. Bei diesen lncRNAs kommen mindestens zwei Isoformen vor. Je nach lncRNA können jedoch teilweise bis zu 40 Isoformen entstehen. [398] Die Funktions- und Regulationsmechanismen des alternativen Spleißens bei lncRNAs sind bisher noch nicht vollständig geklärt. [399-401] Dennoch könnten solche Spleißvarianten einen Grund für die multiplen Banden darstellen. Für die genaue Ursachenforschung wäre ein Ansatz, die Primer oder die Methode weiter zu modifizieren.

Laut *PCR Troubleshooting Guide* von New England BioLabs®, Inc., wären für die weitere Etablierung der Primer verschiedene Möglichkeiten der Modifikation zu nennen. Zum einen könnte man erneut für andere Stellen des Zielgens Primer entwerfen und eventuell die Primer hierbei um etwa 3 Basenpaare verlängern, um die Spezifität zu erhöhen. Zusätzlich könnte man die *Annealing*-Temperatur erhöhen, Mg^{2+} oder andere Detergenzien hinzufügen oder auch die Verdünnung der Primer oder cDNA-Proben

variieren. Da für die Untersuchung aller Primer dieselben Tumor-/ Zelllinien-/ Kontrollproben verwendet wurden, ist nicht von einer Verunreinigung auszugehen. Zur genaueren Abklärung, ob es sich bei den multiplen Banden um spezifische Banden oder Isoformen handelt, könnte weiterhin eine Subklonierung und Sequenzierung erfolgen. Ohne die Gewissheit, dass die Primer lediglich an der gewünschten Stelle der lncRNA binden, kann eine Echtzeit-RT-PCR nicht valide sein. Dementsprechend wurden die sieben lncRNAs für weitere Versuche ausgeschlossen. Hierzu zählten die lncRNAs *AC011899.2*, *AL807761.3*, *AC090617.5*, *AC068888.1*, *AC145124.1*, *AC099343.4* und *UBXN10-AS1*. Die weitere Etablierung der Methode für die lncRNAs *AC011899.2*, *AC068888.1* und *UBXN10-AS1* könnte aufgrund ihrer *antisense* Lage zu schon bekannten, karzinomassoziierten Genen (siehe 4.3.1) für weitere Forschungen interessant sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde allerdings auf eine weitere Ursachenforschung verzichtet.

4.3.3 Expressionsanalysen der lncRNAs *TMEM106A-AS1*, *AC055874.1* und *AL109615.3*

Für die fünf lncRNAs, für die eine Endpunkt-PCR erfolgreich etabliert werden konnte, wurden im Anschluss Echtzeit-RT-PCR Analysen durchgeführt. Hierbei sollten die Expressionsraten der lncRNAs in einer Serie von nicht-neoplastischen Hirngewebe, diffusen und anaplastischen IDH-mutierten Astrozytomen, IDH-Wildtyp Glioblastomen und adhärent wachsenden, bzw. sphärenbildenden Glioblastomzelllinien getestet werden. Die Echtzeit-RT-PCR ließ sich erfolgreich für die lncRNAs *TMEM106A-AS1*, *AC055874.1* und *AL109615.3* etablieren. Hierbei stellten sich verschiedene Expressionsmuster dar.

Bei *TMEM106A-AS1* war eine signifikant erhöhte Expressionsrate in den IDH-mutierten diffusen und anaplastischen Astrozytomen im Vergleich zum nicht-neoplastischen Hirngewebe festzustellen. Bei den Glioblastomtumorproben und in den Glioblastomzelllinien zeigten einige Proben eine ähnlich hohe Expression von *TMEM106A-AS1* wie im nicht-neoplastischen Hirngewebe. Andere Proben zeigten wiederum eine mittlere bis stark erhöhte Expression von *TMEM106A-AS1*.

Im Rahmen der Expressionsanalysen der lncRNA *AL109615.3* sowie der lncRNA *AC055874.1* war eine signifikant verminderte Expression in den IDH-mutierten diffusen und anaplastischen Astrozytomen im Vergleich zum nicht-neoplastischen Hirngewebe festzustellen. Zusätzlich zeigten sowohl *AL109615.3* als auch *AC055874.1* in einigen

Glioblastomtumorproben und Glioblastomzelllinien eine stark erhöhte Expression im Vergleich zum nicht-neoplastischen Hirngewebe. Eine signifikant differentielle Expression war jedoch im Rahmen der Expressionsanalysen bei den Glioblastomtumorproben und -zelllinien nicht nachzuweisen.

Bei allen drei lncRNAs zeigte sich, dass einige Glioblastomproben eine ähnliche hohe und einige eine deutlich erhöhte Expression im Vergleich zum nicht-neoplastischen Hirngewebe aufwiesen. Dies war aufgrund der Auswahl der lncRNAs anhand der Expressionsmuster in Glioblastomen aus dem TCGA-Datensatz zu erwarten. In Kaplan-Meier-Kurven konnte eine Assoziation der Expression dieser lncRNAs mit dem Überleben der Patienten nachgewiesen werden. Hierbei zeigten die Patienten der Gruppe mit einer hohen Expression der jeweiligen lncRNA ein kürzeres medianes Gesamtüberleben (siehe 3.3.1). In diesem Zusammenhang wäre es interessant, im Verlauf ein größeres Kollektiv an IDH-Wildtyp Glioblastomproben auf die Expression der jeweiligen lncRNA zu überprüfen und anschließend mit den entsprechenden Überlebensdaten der Patienten zu vergleichen. In diesem Versuchsaufbau könnte man möglicherweise einen Zusammenhang zwischen der Expression der jeweiligen lncRNA und dem Überleben der Patienten validieren. Für den dritten Teil dieser Arbeit ging es allerdings eher um den Nachweis einer Expression der lncRNAs in den Glioblastomtumorzellen und -zelllinien, um weitere funktionelle Analysen durchführen zu können. Hierfür sollten geeignete Glioblastomzelllinien mit einer hohen Expression der lncRNA ausfindig gemacht werden, um anschließend die möglichen Mechanismen für die Assoziation der Überexpression dieser lncRNAs mit einem kürzeren medianen Überleben der Patienten zu untersuchen.

4.3.4 Bedeutung der lncRNA *AL109615.3* in Glioblastomen

In der univariaten Überlebenszeitanalyse mittels Kaplan-Meier-Kurven war eine hohe Expression von *AL109615.3* in Glioblastomen mit einem verkürzten medianen Überleben der Patienten assoziiert (siehe 3.3.1). Die funktionellen Analysen dienten der Ursachenforschung für diese statistisch signifikante Assoziation. Anhand der Expressionsanalysen waren in den Tumorproben und in den Glioblastomzelllinien jeweils zwei Gruppen auszumachen. Eine Gruppe wies dabei eine ähnlich hohe Expression von *AL109615.3* wie im nicht-neoplastischen Hirngewebe auf und bei der anderen Gruppe zeigte sich eine erhöhte Expression von *AL109615.3* (siehe 3.3.3).

Mittels siPOOL™ gelang ein signifikanter Knockdown von *AL109615.3* von über 90 % im Vergleich zur Kontrolle in drei unabhängigen Versuchen (siehe 3.4.1). Glioblastomzellen mit *AL109615.3*-Knockdown zeigten keine eindeutige Veränderung der Apoptoserate (siehe 3.4.2), allerdings fand sich eine signifikante, auf bis zu 80 % verminderte Proliferation der U87MG Glioblastomzellen (siehe 3.4.3). Zusätzlich zeigte sich eine nicht-signifikante Tendenz zur verminderten Vitalität der U87MG Zellen (siehe 3.4.4) und eine um rund 40 % verminderte Wachstumsrate dieser Zellen nach Knockdown (siehe 3.4.5). Mittels Durchflusszytometrie zeigte sich, dass rund 30 % der Zellen mit *AL109615.3*-Knockdown nekrotisch waren und nur weniger als 3 % apoptotisch. Dies passt zu den Ergebnissen des Caspase-3/7-Assays. Um diese Ergebnisse weiter zu belegen, könnte man zusätzlich einen Apoptose/Nekrose Kit (z.B. AAT Bioquest®, abcam®) verwenden. Durch die Fluoreszenzmarkierung von vitalen, nekrotischen und apoptotischen Zellen, ließe sich eine zusätzliche mikroskopische Beurteilung der Glioblastomzellen nach dem *AL109615.3*-Knockdown vornehmen, um diese Beobachtung zu validieren.

Für weitere Untersuchungen von *AL109615.3* wären im nächsten Schritt verschiedene Dinge wichtig. Zum einen sollte die Expression von *AL109615.3* in größeren Kollektiven von Glioblastomen untersucht werden. Hierzu könnten zum Beispiel weitere Proben der ZNS-Tumorgewebekbank Düsseldorf (CNS-TuBa) auf die Expression von *AL109615.3* untersucht werden. Zur unabhängigen Validierung der prognostischen Assoziation sollte die Expression von *AL109615.3* in dieser neuen Kohorte mit den Überlebenszeitdaten und weiteren prognostisch relevanten Faktoren, wie z.B. Lebensalter der Patienten, Resektionsausmaß und *MGMT*-Promotermethylierungsstatus abgeglichen werden. Mit diesem Ansatz wäre die Expression von *AL109615.3* als potentieller prognostischer Biomarker für Patienten mit einem Glioblastom zu validieren.

Zusätzlich sollten die funktionellen Analysen nach Knockdown der lncRNA *AL109615.3* in weiteren Glioblastomzelllinien wie LN18, CCF-STTG1, LNT229 oder TP365MG sowie Glioblastomstammzelllinien wie GS13, die eine hohe konstitutive *AL109615.3*-Expression aufweisen, validiert werden.

Speziell in Glioblastomen wurden schon weitere lncRNAs gefunden, die als mögliche Biomarker diagnostische und prognostische Hinweise geben könnten. [402] Die enorme Spezifizierung der Anreicherung von lncRNAs in bestimmtem Gewebe qualifiziert die lncRNAs als gute potentielle Biomarker. [398, 403] Um die Rolle von *AL109615.3* in

Glioblastomen weiter zu untersuchen, könnten neben den oben genannten Untersuchungen auch *in vivo* Versuche, beispielsweise mit Hilfe von Gliomxenograften in immundefizienten Mäusen, durchgeführt werden (siehe 4.2.2). Dadurch ließe sich überprüfen, ob ein Knockdown von *AL109615.3* auch *in vivo* zu einem geringeren Tumorwachstum führt.

Im Rahmen weiterer Analysen wäre es zudem interessant zu untersuchen, wie das Transkriptom, Proteom und auch verschiedene Signalwege durch einen Knockdown der lncRNA *AL109615.3* beeinflusst werden. Hierbei sollte auch eine mögliche Interaktion zwischen *AL109615.3*, *C6ORF223* und *hnRNP*K weiter analysiert werden. Das veränderte Expressionsmuster könnte beispielsweise mit Hilfe von RNA-Sequenzierung-basierten Genexpressionsanalysen detailliert untersucht werden. Mittels Echtzeit-RT-PCR könnten differentiell regulierte Gene anschließend nochmals validiert werden, um so einen Überblick über die Auswirkungen des Knockdowns von *AL109615.3* in Glioblastomzellen zu erlangen. [404]

Generell können molekularen Signaturen in Glioblastomen das Verständnis über die Pathogenese erweitern und zusätzlich die Möglichkeit geben, Glioblastome in molekulare Subgruppen einzuteilen. So gab es schon den Versuch, Glioblastome anhand der lncRNA-Expressionsprofile in drei Unterkategorien einzuteilen. Diese Klassifikation von Glioblastomen, nach LncR1-3, entstand aus den Korrelationen von Expressionsdaten von 2448 lncRNAs und Überlebenszeitanalysen auf der Grundlage von Rembrandt- und GSE16011-Datensätzen. Für die Subklassifikation wurden 277 Glioblastomproben des Rembrandt-Datensatzes und 159 Glioblastomproben aus dem GSE16011-Datensatz auf lncRNA-Expressionsraten getestet. Der GSE16011-Datensatz wurde hierbei zur Validierung verwendet. Verglichen mit Überlebenszeitdaten konnten bestimmte Expressionsmuster der lncRNAs mit kürzerem (LncR1) oder längerem Überleben (LncR3) der Patienten assoziiert werden. Diese Studie war ein Versuch, aufgrund von gesammelten lncRNA-Expressionsdaten, eine Verbesserung der Vorhersage der Prognose für Glioblastompatienten zu erreichen. [405]

Eine weitere Studie untersuchte ebenfalls insgesamt 382 Glioblastomproben aus drei verschiedenen Kohorten auf lncRNA-Expressionsprofile. Hierbei zeigte sich eine prognostisch relevante *six-lncRNA signature*, die aus den sechs lncRNAs *KIAA0495*, *PART1*, *MGC21881*, *MIAT*, *GAS5* und *PAR5* besteht. Es konnte ein signifikanter Überlebenszeitunterschied abhängig von der Expression dieser Signatur nachgewiesen

werden. Eine hohe Expression der sechs lncRNAs ging dabei mit einem längeren Überleben einher. [406]

Anhand dieser zwei Beispiele kann man erkennen, dass es hinsichtlich der molekularen Charakterisierung von Glioblastomen auch wichtig ist, Veränderungen auf lncRNA-Ebene zu untersuchen. Ziel solcher molekularer Subgruppen ist der Wunsch, in Zukunft gezielter Therapieverfahren einsetzen zu können, die auf die jeweilige Tumorsubgruppe abgestimmt sind. Bei der Komplexität des menschlichen Körpers und den vielfältigen Wechselwirkungen innerhalb einer Zelle, kann es nicht nur einen einzelnen Faktor geben, der über die Prognose eines Glioblastompatienten und weitere Therapiemöglichkeiten entscheidet. Die weitere Erforschung molekularer Signaturen ist somit für die Verbesserung der Prognose- und Therapiemöglichkeiten essenziell. In diesem Sinne konnte die Identifizierung und die funktionellen Analysen der lncRNA *AL109615.3* einen kleinen Teil dazu beitragen, Glioblastome auf molekularer Ebene besser zu verstehen.

4.4 Schlussfolgerung

Diese Dissertation gliedert sich in drei Teile. Im ersten Teil wurde der mögliche Zusammenhang zwischen der Expression der Kopf-an-Kopf liegenden Gene *RAD51-AS1* und *RAD51* auf Transkriptebene in Glioblastomzelllinien und Glioblastomen untersucht. Hierbei konnte die ursprüngliche Grundlage der Arbeitshypothese nicht validiert werden, da keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen parentalen (TMZ-sensitiven) und TMZ-resistenten Glioblastomzelllinien, sowie zwischen unbehandelten primären Glioblastomen und Rezidivglioblastomen nach Radiochemotherapie mit TMZ nachgewiesen werden konnten. Generell ist die Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen den beiden Genen weiterhin interessant, da solche *antisense* Lagen häufig mit Interaktionen einher gehen. Zusätzlich wurden in der Literatur bereits mögliche Zusammenhänge zwischen der lncRNA *RAD51-AS1* und dem DNA-Reparaturgen *RAD51* in Karzinomen beschrieben. Die Frage nach einer möglichen Wechselwirkung zwischen den beiden Genen in Glioblastomen konnte in dieser Arbeit jedoch nicht abschließend geklärt werden. Für weitere Untersuchungen sollte eine größere Zahl parentaler und TMZ-resistenter Glioblastomzelllinien auf die Expressionsraten der beiden Gene getestet werden. Weiterhin könnte ein Knockdown von *RAD51-AS1* mittels ASO- oder CRISPR/Cas9-Methode etabliert werden, da diese lncRNA überwiegend im Nukleus exprimiert wird. Anhand des Knockdowns könnten die Auswirkungen von *RAD51-AS1* auf die Glioblastomzellen und im speziellen auf *RAD51* weiter untersucht werden.

Im zweiten Teil dieser Dissertation konnte ein effektiver Knockdown der hauptsächlich im Zytoplasma lokalisierten lncRNA *AL109615.3* von über 90 % in U87MG Glioblastomzellen etabliert werden. Hierfür wurden die Zellen mit siRNA-Pools (siPOOL™) transfiziert. Eine Transfektion von U251MG und T98G Glioblastomzellen mittels einzelner siRNAs und siRNA-Pools gegen die überwiegend im Nukleus lokalisierte lncRNA *RAD51-AS1* konnte dagegen nicht den gewünschten Effekt erzielen. Eine Erklärung für diese Effizienzunterschiede ist möglicherweise die unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation der beiden lncRNAs. Die Frage nach einem Effizienzunterschied des Knockdowns zwischen einzelnen siRNAs und siRNA-Pools konnte in diesem Versuchsaufbau nicht abschließend geklärt werden. Für die Untersuchung dieses Aspektes könnte man weiterhin Glioblastomzelllinien mittels einzelner siRNAs gegen *AL109615.3* transfizieren. Nachfolgend könnte die Effizienz des

Knockdowns von *AL109615.3* im direkten Vergleich von einzelnen siRNAs und siRNA-Pools beurteilt werden.

Im dritten Teil dieser Arbeit sollte der mögliche Einfluss von Prognose-assoziierten lncRNAs auf die Vitalität und auf Proliferations-, Wachstums- und Apoptoseraten von Glioblastomzellen untersucht werden. Die funktionellen Analysen nach Knockdown der lncRNA *AL109615.3* konnten einen möglichen stimulierenden Einfluss von *AL109615.3* auf die Proliferation von Glioblastomzellen nachweisen. Nach Knockdown von *AL109615.3* war eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate, ein vermindertes Wachstum, eine Tendenz zur verminderten Vitalität und eine erhöhte Apoptoserate in U87MG Glioblastomzellen nachweisbar. Diese Beobachtungen sollten in weiteren Zelllinien validiert werden. Weiterhin sollten Colony forming-, Migrations- und Invasionsassays durchgeführt werden, um die funktionellen Auswirkungen des lncRNA-Knockdowns weiter zu charakterisieren. Anschließend könnten Genexpressionsanalysen für eine umfassendere Analyse der molekularen Veränderungen nach Knockdown von *AL109615.3* durchgeführt werden. Hierbei bestünde zudem die Möglichkeit, den möglichen Einfluss auf das *antisense* liegende Gen *C6ORF223* und die mögliche Interaktion mit *hnRNP*K und p53 zu untersuchen. Die eigenen Ergebnisse lassen vermuten, dass *AL109615.3* möglicherweise als Biomarker in Glioblastomen fungieren könnte. Zusätzlich könnte ein gezielter Knockdown eventuell zu einem verminderten Tumorwachstum führen. Für die weitere Validierung sollte ein größeres Kollektiv an Glioblastomproben auf die Expression von *AL109615.3* hin untersucht und anschließend die Expressionsraten mit den Überlebensdaten der Patienten verglichen werden. Zusätzlich wäre durch *in vivo* Versuche der Einfluss einer Modulation von *AL109615.3* auf das Tumorwachstum zu bestimmen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine Beschäftigung mit lncRNAs im Rahmen der Erforschung molekularer Veränderungen in Glioblastomzellen vielversprechend ist. Ob einzelne lncRNAs, wie *AL109615.3*, als Biomarker oder mögliches Therapieziel eingesetzt werden können, lässt sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht abschätzen. Bei der hohen Anzahl an veränderten lncRNAs in Glioblastomen ist eventuell der Nachweis von lncRNA-Signaturen, bestehend aus Gruppen veränderter lncRNAs, als potentieller diagnostischer oder prognostischer Marker vielversprechender.

Diese Arbeit konnte ein Stück weit die möglichen Funktions- und Wirkungsweisen von lncRNAs in Glioblastomzellen beleuchten. Um in Zukunft eine Verbesserung der

Diagnostik und insbesondere der Therapiemöglichkeiten von Glioblastomen zu erreichen, ist eine stetige Erweiterung des Wissens um die molekularen Grundlagen unerlässlich. Weitere Studien zur näheren Untersuchung und Charakterisierung der lncRNA *AL109615.3* wären somit sinnvoll.

5. Literatur – und Quellenverzeichnis

1. Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut (2019): Datensatz des ZfKD auf Basis der epidemiologischen Landes-krebs-register-daten, v.D.b.V.E. and d. 10.18444/5.03.01.0005.0013.0001, *Krebsregister*.
2. Ostrom, Q.T., et al., *CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014*. Neuro Oncol, 2017. **19**(suppl_5): p. v1-v88.
3. Kraywinkel, K., et al., *Epidemiology of primary brain tumors in children and adults in Germany*. Der Onkologe, 2018. **25**: p. 5-9.
4. Lapointe, S., et al., *Primary brain tumours in adults*. The Lancet, 2018. **392**(10145): p. 432-446.
5. Kleihues, P., et al., *Histopathology, classification, and grading of gliomas*. Glia 1995. **5**: p. 211-221.
6. Ostrom, Q.T., et al., *Risk factors for childhood and adult primary brain tumors*. Neuro Oncol, 2019. **21**(11): p. 1357-1375.
7. Bondy, M.L., et al., *Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium*. Cancer, 2008. **113**(7 Suppl): p. 1953-68.
8. Krex, D., et al., *Long-term survival with glioblastoma multiforme*. Brain, 2007. **130**(Pt 10): p. 2596-606.
9. Ohgaki, H., et al., *Epidemiology and etiology of gliomas*. Acta Neuropathol, 2005. **109**(1): p. 93-108.
10. Inskip P.D., et al., *Etiology of Brain Tumors in Adults*. Epidemiol Reviews, 1995. **17**: p. 382 – 414.
11. Preston, D.L., et al., *Tumors of the Nervous System and Pituitary Gland Associated With Atomic Bomb Radiation Exposure*. Journal of the National Cancer Institute, 2002. **94**: p. 1555 – 1563.
12. Davis, F., et al., *Medical diagnostic radiation exposures and risk of gliomas*. Radiat Res, 2011. **175**(6): p. 790-6.
13. Neglia, J.P., et al., *Second Neoplasms after Acute Lymphoblastic Leukemia in Childhood*. The new england journal of medicine, 1991. **325**: p. 1330-1336.
14. Cordier, S., et al., *Parental Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and the Risk of Childhood Brain Tumors*. Am J Epidemiol, 2004. **159**: p. 1109–1116.
15. Shao, C., et al., *Smoking and Glioma Risk: Evidence From a Meta-Analysis of 25 Observational Studies*. Medicine (Baltimore), 2016. **95**(2): p. e2447.
16. Boeing, H., et al., *Dietary carcinogens and the risk for glioma and meningioma in Germany*. Int J Cancer, 1993. **53**: p. 561–565.
17. Linet, M.S., et al., *Cellular (Mobile) Telephone Use and Cancer Risk*. Rev Environ Health, 2010. **25**: p. 51-55.
18. Johansen, C., et al., *Cellular Telephones and Cancer—a Nationwide Cohort Study in Denmark* J Natl Cancer Inst 2001. **93**: p. 203-207.
19. Muscat, J.E., et al., *Handheld Cellular Telephone Use and Risk of Brain Cancer*. JAMA, 2000. **284**: p. 3001-3007.
20. Amirian, E.S., et al., *Aspirin, NSAIDs, and Glioma Risk: Original Data from the Glioma International Case-Control Study and a Meta-analysis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2019. **28**(3): p. 555-562.

21. Schwartzbaum, J., et al., *Cohort studies of association between self-reported allergic conditions, immune-related diagnoses and glioma and meningioma risk*. Int J Cancer, 2003. **106**(3): p. 423-8.
22. Wiemels, J.L., et al., *History of allergies among adults with glioma and controls*. Int J Cancer, 2002. **98**(4): p. 609-15.
23. Brenner, A.V., et al., *History of allergies and autoimmune diseases and risk of brain tumors in adults*. Int J Cancer, 2002. **99**(2): p. 252-9.
24. Cobbs, C.S., *Evolving evidence implicates cytomegalovirus as a promoter of malignant glioma pathogenesis*. Herpesviridae, 2011. **2**(1): p. 10.
25. Louis, D.N., et al., *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. Acta Neuropathol, 2016. **131**(6): p. 803-20.
26. Smith, C., et al., *Diagnosis and pathogenesis of gliomas*. Current Diagnostic Pathology, 2007. **13**(3): p. 180-192.
27. Weller, M., et al., *Glioma*. Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15017.
28. Koshy, M., et al., *Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries*. J Neurooncol, 2012. **107**(1): p. 207-12.
29. Nakada, M., et al., *Aberrant signaling pathways in glioma*. Cancers (Basel), 2011. **3**(3): p. 3242-78.
30. Urbanska, K., et al., *Glioblastoma multiforme - an overview*. Contemp Oncol (Pozn), 2014. **18**(5): p. 307-12.
31. Comelli, I., et al., *Clinical presentation and epidemiology of brain tumors firstly diagnosed in adults in the Emergency Department: a 10-year, single center retrospective study*. Ann Transl Med, 2017. **5**(13): p. 269.
32. Ozawa, M., et al., *Symptoms in primary care with time to diagnosis of brain tumours*. Fam Pract, 2018. **35**(5): p. 551-558.
33. Salander, P., et al., *Pathways from symptoms to medical care- a descriptive study of symptom development and obstacles to early diagnosis in brain tumour patients*. Fam Pract 1999. **16**: p. 142-148.
34. Roth, P., et al., *Tumor-associated edema in brain cancer patients: pathogenesis and management*. Expert Rev Anticancer Ther, 2013. **13**(11): p. 1319-25.
35. Hanif, F., et al., *Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment*. Asian Pac J Cancer Prev, 2017. **18**(1): p. 3-9.
36. Omuro, A., et al., *Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review*. JAMA, 2013. **310**(17): p. 1842-50.
37. Müllges, W., et al., *Hirndruck. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*, ed. H.C. Diener, Putzki, N., Berlit, P., et al. Vol. 4. 2008, Stuttgart: p.: 868-877.
38. Mattle, H., et al., *Neurologie*. Vol. 13. 2013: Thieme: p. 737.
39. Taylor, L.P., *Mechanism of brain tumor headache*. Headache, 2014. **54**(4): p. 772-5.
40. Lun, M., et al., *The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme*. J Neurooncol, 2011. **105**(2): p. 261-73.
41. Luzzati, R., et al., *Calvarial tuberculosis as the initial presentation of AIDS*. J Clin Neurosci, 2006. **13**(6): p. 675-7.
42. Widjaja, A., et al., *Uncommon Metastasis of a Glioblastoma Multiforme in Liver and Spleen* Digestion, 2000. **61**: p. 219-222.
43. Robert, M., et al., *Glioblastoma multiforme: a rare manifestation of extensive liver and bone metastases*. Biomed Imaging Interv J, 2008. **4**(1): p. e3.

44. Smith, D.R., et al., *Metastasizing Neuroectodermal Tumors of the Central Nervous System*. J Neurosurg 1969. **31**: p. 50-58.
45. Louis, D.N., et al., *International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading*. Brain Pathol, 2014. **24**(5): p. 429-35.
46. Forst, D.A., et al., *Low-grade gliomas*. Oncologist, 2014. **19**(4): p. 403-13.
47. Felsberg, J., et al., *Prognostic significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(21): p. 6683-93.
48. Ohgaki, H. et al., *Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study*. Cancer Res, 2004. **64**: p. 6892–9.
49. Ohgaki, H., et al., *Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1445-53.
50. Cohen, A.L., et al., *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2013. **13**(5): p. 345.
51. Yan, H., et al., *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. N Engl J Med, 2009. **360**(8): p. 765-73.
52. Lee, S.M., et al., *Cytosolic NADP+ - dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells*. Free Radical Biology&Medicine, 2002. **32**: p. 1185-1196.
53. Reifenberger, G., et al., *Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy*. Nat Rev Clin Oncol, 2017. **14**(7): p. 434-452.
54. Ohgaki, H., et al., *The definition of primary and secondary glioblastoma*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(4): p. 764-72.
55. Zilfou, J.T., et al., *Tumor suppressive functions of p53*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(5): p. a001883.
56. Crighton, D., et al., *DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis*. Cell, 2006. **126**(1): p. 121-34.
57. Crighton, D., et al., *DRAM links autophagy to p53 and programmed cell death*. Autophagy, 2007. **3**(1): p. 72-4.
58. Fridman, J.S., et al., *Control of apoptosis by p53*. Oncogene, 2003. **22**(56): p. 9030-40.
59. Lane, D.P., *p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. **358**: p. 15-16.
60. Heaphy, C.M., et al., *Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations*. Science, 2011. **333**(6041): p. 425.
61. Jiao, Y., et al., *Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas*. Oncotarget, 2012. **3**: p. 709-722.
62. Liu, X.Y., et al., *Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations*. Acta Neuropathol, 2012. **124**(5): p. 615-25.
63. Ichimiura, K., et al., *Distinct Patterns of Deletion on 10p and 10q Suggest Involvement of Multiple Tumor Suppressor Genes in the Development of Astrocytic Gliomas of Different Malignancy Grades*. Genes, chromosomes & cancer, 1998. **22**: p. 9-15.
64. Fujisawa, H., et al., *Loss of Heterozygosity on Chromosome 10 Is More Extensive in Primary (De Novo) Than in Secondary Glioblastomas*. Laboratory Investigation, 2000. **80**: p. 65-72.

65. Brown, V.L., et al., *p16INK4a and p14ARF tumor suppressor genes are commonly inactivated in cutaneous squamous cell carcinoma*. J Invest Dermatol, 2004. **122**(5): p. 1284-92.
66. Killela, P.J., et al., *TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal*. PNAS, 2013. **110**: p. 6201-6026.
67. Hochberg, F.H., et al., *Glioma diagnostics and biomarkers: an ongoing challenge in the field of medicine and science*. Expert Rev Mol Diagn, 2014. **14**(4): p. 439-52.
68. Heidenreich, B., et al., *TERT promoter mutations in cancer development*. Curr Opin Genet Dev, 2014. **24**: p. 30-7.
69. Liu, J., et al., *Significance of TERT and ATRX mutations in glioma*. Oncology letters, 2019. **17**: p. 95-102.
70. Lotsch, D., et al., *Prognostic significance of telomerase-associated parameters in glioblastoma: effect of patient age*. Neuro Oncol, 2013. **15**(4): p. 423-32.
71. Boldrini, L., et al., *Telomerase activity and hTERT mRNA expression in glial tumors*. International journal of oncology, 2006. **28**: p. 1555-1560.
72. Yuan, Y., et al., *TERT mutation in glioma: Frequency, prognosis and risk*. J Clin Neurosci, 2016. **26**: p. 57-62.
73. Li, G., et al., *Expression of epidermal growth factor variant III (EGFRvIII) in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas*. J Neurooncol, 2012. **108**(3): p. 395-402.
74. Wong, A.J., et al., *Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification*. Medical science, 1987. **84**: p. 6899-6903.
75. Libermann, T.A., et al., *Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin*. Nature, 1985. **313**: p. 144-147.
76. Cantanhede, I.G., et al., *PDGF Family Expression in Glioblastoma Multiforme: Data Compilation from Ivy Glioblastoma Atlas Project Database*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 15271.
77. Verhaak, R.G., et al., *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1*. Cancer Cell, 2010. **17**(1): p. 98-110.
78. Cao, Y., et al., *Multifarious functions of PDGFs and PDGFRs in tumor growth and metastasis*. Trends Mol. Med. , 2013. **19**: p. 406-473.
79. Li, J., et al., *PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer*. Science, 1997. **275**(5308): p. 1943-7.
80. Koul, D., *PTEN signaling pathways in glioblastoma*. Cancer Biol Ther, 2008. **7**(9): p. 1321-5.
81. Ming, M., et al., *PTEN in DNA damage repair*. Cancer Lett, 2012. **319**(2): p. 125-129.
82. Ortega-Molina, A., et al., *PTEN in cancer, metabolism, and aging*. Trends Endocrinol Metab, 2013. **24**(4): p. 184-9.
83. Han, F., et al., *PTEN gene mutations correlate to poor prognosis in glioma patients: a meta-analysis*. Onco Targets Ther, 2016. **9**: p. 3485-92.
84. Paolillo, M., et al., *Glioblastoma under Siege: An Overview of Current Therapeutic Strategies*. Brain Sci, 2018. **8**(1): p. 1-13.
85. Weller, M., et al., *Gliome, Aktuelle Entwicklungen in der Diagnostik und Therapie*. Dtsch Arztebl, 2016. **1**: p. 18-20.

86. Stupp, R., et al., *Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours*. The Lancet Oncology, 2001. **2**(9): p. 552-560.
87. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma*. New england journal of medicine, 2005: p. 987-96.
88. Broggini-Tenzer, A., et al., *Die Wirkung der Radiotherapie auf molekularer Ebene*. Schweizer Zeitschrift für Onkologie, 2015. **1**: p. 1-4.
89. Horsman, M.R., et al., *The impact of hypoxia and its modification of the outcome of radiotherapy*. J Radiat Res, 2016. **57**: p. i90-i98.
90. Khanna, K., et al., *DNA double-strand breaks- signaling, repair and the cancer connection*. Nat Genet., 2001. **27**: p. 247-254.
91. Biau, J., et al., *Altering DNA Repair to Improve Radiation Therapy: Specific and Multiple Pathway Targeting*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 1009.
92. Kesari, S., *Understanding glioblastoma tumor biology: the potential to improve current diagnosis and treatments*. Semin Oncol, 2011. **38**: p. S2-10.
93. Westphal, M., et al., *A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma*. Neuro-Oncology, 2003.: p. 79-88.
94. Buonerba, C., et al., *A comprehensive outlook on intracerebral therapy of malignant gliomas*. Crit Rev Oncol Hematol, 2011. **80**(1): p. 54-68.
95. Perry, J., et al., *Gliadel wafers in the treatment of malignant glioma- a systematic review* Current Oncology, 2007. **14**: p. 189-194.
96. Brem, H., et al., *Biodegradable polymers for controlled delivery of chemotherapy with and without radiation therapy in the monkey brain*. Neurosurgery, 1994. **80**: p. 283-290.
97. Yung, W.K., et al., *A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse*. Br J Cancer, 2000. **83**(5): p. 588-93.
98. Friedman, H.S., et al., *Temozolomide and Treatment of Malignant Glioma*. Clinical cancer research, 2000. **6**: p. 2585-2597.
99. Armstrong, T.S., et al., *Risk analysis of severe myelotoxicity with temozolomide: The effects of clinical and genetic factors*. Neuro-Oncology, 2009. **11**(6): p. 825-832.
100. O'Reilly, S.M., et al., *Temozolomide- a new oral cytotoxic chemotherapeutic agent with promising activity against primary brain tumours*. Eur J. Cancer, 1993. **29A**: p. 940-942.
101. van Genugten, J.A., et al., *Effectiveness of temozolomide for primary glioblastoma multiforme in routine clinical practice*. J Neurooncol, 2010. **96**(2): p. 249-57.
102. Denny B.J., et al., *NMR and Molecular Modeling Investigation of the Mechanism of Activation of the Antitumor Drug Temozolomide and Its Interaction with DNA*. Biochemistry 1994. **33**: p. 9045-51.
103. Newlands, E.S., et al., *Temozolomide- a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials*. Cancer treatment reviews, 1997. **23**: p. 35-61.
104. Stupp, R., et al., *Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial*. The Lancet Oncology, 2014. **15**(10): p. 1100-1108.
105. Preusser, M., et al., *Anti-O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: observer variability and lack*

- of association with patient survival impede its use as clinical biomarker.* Brain Pathol, 2008. **18**(4): p. 520-32.
106. Hegi, M.E., et al., *MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma.* The new england journal of medicine, 2005.: p. 997-1003.
 107. Wick, W., et al., *MGMT testing—the challenges for biomarker-based glioma treatment.* Nature Reviews Neurology, 2014. **10**: p. 372.
 108. Esteller, M., et al., *Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents.* The new england journal of medicine, 2000. **343**(19): p. 1350-1354.
 109. Chen, Z.P., et al., *Clinical response of O6-methylguanine-DNA methyltransferase levels to 1,3-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea chemotherapy in glioma patients.* Neurol Sci 1999. **26**: p. 104-109.
 110. Qian, X.C., et al., *Methylation Hot Spots in the 5' Flanking Region Denote Silencing of the O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Gene.* Cancer Res, 1997. **57**: p. 3672–7.
 111. Sun, Q., et al., *Up-regulation of MSH6 is associated with temozolomide resistance in human glioblastoma.* Biochem Biophys Res Commun, 2018. **496**(4): p. 1040-1046.
 112. Xie, C., et al., *Association of MSH6 mutation with glioma susceptibility, drug resistance and progression.* Mol Clin Oncol, 2016. **5**(2): p. 236-240.
 113. Bryant, H.E., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors as potential chemotherapeutic agents.* Biochem Soc Trans 2005. **32**: p. 959–61.
 114. Gupta, S.K., et al., *PARP Inhibitors for Sensitization of Alkylation Chemotherapy in Glioblastoma: Impact of Blood-Brain Barrier and Molecular Heterogeneity.* Front Oncol, 2018. **8**: p. 670.
 115. Sarkaria, J.N., et al., *Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma.* Clin Cancer Res, 2008. **14**: p. 2900-2908.
 116. Mazor, G., et al., *The lncRNA TP73-AS1 is linked to aggressiveness in glioblastoma and promotes temozolomide resistance in glioblastoma cancer stem cells.* Cell Death Dis, 2019. **10**(3): p. 246.
 117. Jia, L., et al., *The silencing of LncRNA-H19 decreases chemoresistance of human glioma cells to temozolomide by suppressing epithelial-mesenchymal transition via the Wnt/beta-Catenin pathway.* Onco Targets Ther, 2018. **11**: p. 313-321.
 118. Kim, S.S., et al., *Targeted nanocomplex carrying siRNA against MALAT1 sensitizes glioblastoma to temozolomide.* Nucleic Acids Res, 2018. **46**(3): p. 1424-1440.
 119. Chen, W., et al., *MALAT1 is a prognostic factor in glioblastoma multiforme and induces chemoresistance to temozolomide through suppressing miR-203 and promoting thymidylate synthase expression.* Oncotarget, 2017. **8**: p. 22783-22799.
 120. Frith, M.C., et al., *The amazing complexity of the human transcriptome.* Eur J Hum Genet, 2005. **13**(8): p. 894-7.
 121. Kapranov, P., et al., *Genome-wide transcription and the implications for genomic organization.* Nat Rev Genet, 2007. **8**(6): p. 413-23.
 122. Carnici, P., et al., *The Transcriptional Landscape of the Mammalian Genome* Science, 2005. **309**: p. 1559-1563.
 123. Mattick, J.S., et al., *Non-coding RNA.* Hum Mol Genet, 2006. **15 Spec No 1**: p. R17-29.
 124. Anastasiadou, E., et al., *Non-coding RNA networks in cancer.* Nat Rev Cancer, 2018. **18**(1): p. 5-18.

125. Lekka, E., et al., *Noncoding RNAs in disease*. FEBS Lett, 2018. **592**(17): p. 2884-2900.
126. Kim, V.N., et al., *Biogenesis of small RNAs in animals*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(2): p. 126-39.
127. Wapinski, O., et al., *Long noncoding RNAs and human disease*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(6): p. 354-61.
128. Kung, J.T., et al., *Long noncoding RNAs: past, present, and future*. Genetics, 2013. **193**(3): p. 651-69.
129. Spizzo, R., et al., *Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research?* Oncogene, 2012. **31**(43): p. 4577-87.
130. Ponting, C.P., et al., *Evolution and functions of long noncoding RNAs*. Cell, 2009. **136**(4): p. 629-41.
131. Ponjavic, J., et al., *Functionality or transcriptional noise? Evidence for selection within long noncoding RNAs*. Genome Res, 2007. **17**(5): p. 556-65.
132. Pang, K.C., et al., *Rapid evolution of noncoding RNAs- lack of conservation does not mean lack of function*. Trends in Genetics, 2006. **22**: p. 1-5.
133. Necsulea, A., et al., *The evolution of lncRNA repertoires and expression patterns in tetrapods*. Nature, 2014. **505**(7485): p. 635-40.
134. Kashi, K., et al., *Discovery and functional analysis of lncRNAs: Methodologies to investigate an uncharacterized transcriptome*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1859**(1): p. 3-15.
135. Guttman, M., et al., *Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals*. Nature, 2009. **458**(7235): p. 223-7.
136. Marchese, F.P., et al., *The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function*. Genome Biol, 2017. **18**(1): p. 206.
137. Salviano-Silva, A., et al., *Besides Pathology: Long Non-Coding RNA in Cell and Tissue Homeostasis*. Noncoding RNA, 2018. **4**(1): p. 1-30.
138. Balbin, O.A., et al., *The landscape of antisense gene expression in human cancers*. Genome Res, 2015. **25**(7): p. 1068-79.
139. Harrow, J., et al., *GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project*. Genome Res, 2012. **22**(9): p. 1760-74.
140. Mercer, T.R., et al., *Long non-coding RNAs- insights into functions*. Genetics, 2009. **10**: p. 155-159.
141. Quinn, J.J., et al., *Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function*. Nat Rev Genet, 2016. **17**(1): p. 47-62.
142. Barr, M.L., et al., *A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis*. Nature, 1949. **163**(4148): p. 676.
143. Brown, C.J.H., et al., *The human XIST gene- Analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus*. Cell, 1992. **71**: p. 527-542.
144. Brockdorff, N.A., et al., *The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus*. Cell 1992. **71**: p. 515-526.
145. Gayen, S., et al., *A Primary Role for the Tsix lncRNA in Maintaining Random X-Chromosome Inactivation*. Cell Rep, 2015. **11**(8): p. 1251-65.
146. Orom, U.A., et al., *Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells*. Cell, 2010. **143**(1): p. 46-58.

147. Zhou, Y., et al., *Activation of p53 by MEG3 non-coding RNA*. J Biol Chem, 2007. **282**(34): p. 24731-42.
148. Wang, K.C., et al., *Molecular mechanisms of long noncoding RNAs*. Mol Cell, 2011. **43**(6): p. 904-14.
149. Rinn, J.L., et al., *Genome regulation by long noncoding RNAs*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 145-66.
150. Hu, K., et al., *LncRNA AK015322 promotes proliferation of spermatogonial stem cell C18-4 by acting as a decoy for microRNA-19b-3p*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2017. **53**(3): p. 277-284.
151. Geisler, S., et al., *RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(11): p. 699-712.
152. Balas, M.M., et al., *Exploring the mechanisms behind long noncoding RNAs and cancer*. Noncoding RNA Res, 2018. **3**(3): p. 108-117.
153. Park, J.Y., et al., *Roles of Long Non-Coding RNAs on Tumorigenesis and Glioma Development*. Brain Tumor Res Treat, 2014. **2**(1): p. 1-6.
154. Tsai, M.C., et al., *Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes*. Science, 2010. **329**(5992): p. 689-93.
155. Tripathi, V., et al., *The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation*. Mol Cell, 2010. **39**(6): p. 925-38.
156. Yoon, J.H., et al., *Posttranscriptional gene regulation by long noncoding RNA*. J Mol Biol, 2013. **425**(19): p. 3723-30.
157. Wilusz, J.E., et al., *Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world*. Genes Dev, 2009. **23**(13): p. 1494-504.
158. Zhang, J., et al., *LncmiRSRN: identification and analysis of long non-coding RNA related miRNA sponge regulatory network in human cancer*. Bioinformatics, 2018. **34**(24): p. 4232-4240.
159. Xu, F., et al., *Long non-coding RNA HOTAIR functions as miRNA sponge to promote the epithelial to mesenchymal transition in esophageal cancer*. Biomed Pharmacother, 2017. **90**: p. 888-896.
160. Sato-Kuwabara, Y., et al., *The fusion of two worlds: non-coding RNAs and extracellular vesicles--diagnostic and therapeutic implications (Review)*. Int J Oncol, 2015. **46**(1): p. 17-27.
161. Maurano, M.T., et al., *Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA*. Science, 2012. **337**(6099): p. 1190-5.
162. Schmitt, A.M., et al., *Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways*. Cancer Cell, 2016. **29**(4): p. 452-463.
163. Huarte, M., et al., *Large non-coding RNAs: missing links in cancer?* Hum Mol Genet, 2010. **19**(R2): p. R152-61.
164. Niland, C.N., et al., *Emerging Roles for Long Non-Coding RNAs in Cancer and Neurological Disorders*. Front Genet, 2012. **3**: p. 25.
165. Jones, P.A., et al., *The epigenomics of cancer*. Cell, 2007. **128**(4): p. 683-92.
166. Wang, C., et al., *LncRNA Structural Characteristics in Epigenetic Regulation*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(12): p. 1-11.
167. Iyer, M.K., et al., *The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome*. Nat Genet, 2015. **47**(3): p. 199-208.
168. Rasool, M., et al., *Non-coding RNAs in cancer diagnosis and therapy*. Noncoding RNA Res, 2016. **1**(1): p. 69-76.
169. Bussemakers, M.J., et al., *DD3-A New Prostate-specific Gene, Highly Overexpressed in Prostate Cancer*. Cancer Res, 1999. **59**: p. 5975–5979.

170. Wei, J.T., et al., *Can urinary PCA3 supplement PSA in the early detection of prostate cancer?* J Clin Oncol, 2014. **32**(36): p. 4066-72.
171. Day, J.R., et al., *PCA3: from basic molecular science to the clinical lab.* Cancer Lett, 2011. **301**(1): p. 1-6.
172. Loeb, S., et al., *PCA3 Urinary Biomarker for Prostate Cancer* Reviews in urology, 2010. **12**: p. 205-206.
173. Shao, Y., et al., *Gastric juice long noncoding RNA used as a tumor marker for screening gastric cancer.* Cancer, 2014. **120**(21): p. 3320-8.
174. Hashad, D., et al., *Evaluation of the Role of Circulating Long Non-Coding RNA H19 as a Promising Novel Biomarker in Plasma of Patients with Gastric Cancer.* J Clin Lab Anal, 2016. **30**(6): p. 1100-1105.
175. Li, H., et al., *Overexpression of lncRNA H19 enhances carcinogenesis and metastasis of gastric cancer.* Oncotarget, 2014. **5**: p. 2318-2329.
176. Hajjari, M., et al., *HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers.* Cancer Biol Med, 2015. **12**(1): p. 1-9.
177. Tang, Q., et al., *HOTAIR: An Oncogenic Long Non-Coding RNA in Human Cancer.* Cell Physiol Biochem, 2018. **47**(3): p. 893-913.
178. Bhan, A., et al., *LncRNA HOTAIR: A master regulator of chromatin dynamics and cancer.* Biochim Biophys Acta, 2015. **1856**(1): p. 151-64.
179. Gupta, R.A., et al., *Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis.* Nature, 2010. **464**(7291): p. 1071-6.
180. Sorensen, K.P., et al., *Long non-coding RNA HOTAIR is an independent prognostic marker of metastasis in estrogen receptor-positive primary breast cancer.* Breast Cancer Res Treat, 2013. **142**(3): p. 529-36.
181. Kogo, R., et al., *Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers.* Cancer Res, 2011. **71**(20): p. 6320-6.
182. Luo, Z.F., et al., *Clinical significance of HOTAIR expression in colon cancer.* World J Gastroenterol, 2016. **22**(22): p. 5254-9.
183. Fan, Y., et al., *Long non-coding RNA UCA1 increases chemoresistance of bladder cancer cells by regulating Wnt signaling.* FEBS J, 2014. **281**(7): p. 1750-8.
184. Pestell, R.G., et al., *Long and noncoding RNAs (lnc-RNAs) determine androgen receptor dependent gene expression in prostate cancer growth in vivo.* Asian J Androl, 2014. **16**(2): p. 268-9.
185. Wang, M., et al., *Long non-coding RNA TUG1 mediates 5-fluorouracil resistance by acting as a ceRNA of miR-197-3p in colorectal cancer.* J Cancer, 2019. **10**(19): p. 4603-4613.
186. Li, Z., et al., *Knockdown of lncRNA-HOTAIR downregulates the drug-resistance of breast cancer cells to doxorubicin via the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.* Exp Ther Med, 2019. **18**(1): p. 435-442.
187. Niu, Y., et al., *Long non-coding RNA TUG1 is involved in cell growth and chemoresistance of small cell lung cancer by regulating LIMK2b via EZH2.* Mol Cancer, 2017. **16**(1): p. 5.
188. Wang, J., et al., *The long noncoding RNA H19 promotes tamoxifen resistance in breast cancer via autophagy.* J Hematol Oncol, 2019. **12**(1): p. 81-95.
189. Wang, J., et al., *The role of long non-coding RNA H19 in breast cancer.* Oncol Lett, 2020. **19**(1): p. 7-16.
190. Zhu, Q.-N., et al., *LncRNA H19 is a major mediator of doxorubicin chemoresistance in breast cancer cells through a cullin4A-MDR1 pathway.* Oncotarget, 2017. **8**: p. 91990-92003.

191. Mehler, M.F., et al., *Noncoding RNAs and RNA editing in brain development, functional diversification, and neurological disease*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(3): p. 799-823.
192. Mehler, M.F., et al., *Non-coding RNAs in the nervous system*. *J Physiol*, 2006. **575**(Pt 2): p. 333-41.
193. Mercer, T.R., et al., *Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(2): p. 716-21.
194. Li, L., et al., *Long Non-coding RNA in Neuronal Development and Neurological Disorders*. *Front Genet*, 2018. **9**: p. 744.
195. Zeng, T., et al., *Exploring Long Noncoding RNAs in Glioblastoma: Regulatory Mechanisms and Clinical Potentials*. *Int J Genomics*, 2018. **2018**: p. 2895958.
196. Han, L., et al., *LncRNA profile of glioblastoma reveals the potential role of lncRNAs in contributing to glioblastoma pathogenesis*. *Int J Oncol*, 2012. **40**(6): p. 2004-12.
197. Liu, S., et al., *The Potential Roles of Long Noncoding RNAs (lncRNA) in Glioblastoma Development*. *Mol Cancer Ther*, 2016. **15**(12): p. 2977-2986.
198. Chen, G., et al., *Analysis of long non-coding RNA expression profiles identifies novel lncRNA biomarkers in the tumorigenesis and malignant progression of gliomas*. *Oncotarget*, 2017. **8**: p. 67744-67753.
199. Reon, B.J., et al., *Expression of lncRNAs in Low-Grade Gliomas and Glioblastoma Multiforme: An In Silico Analysis*. *PLoS Med*, 2016. **13**(12): p. e1002192.
200. Shi, Y., et al., *Long non-coding RNA H19 promotes glioma cell invasion by deriving miR-675*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e86295.
201. Sun, Y., et al., *Long non-coding RNAs as potential biomarkers and therapeutic targets for gliomas*. *Med Hypotheses*, 2013. **81**(2): p. 319-21.
202. Li, J., et al., *Targeting Long Noncoding RNA in Glioma: A Pathway Perspective*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018. **13**: p. 431-441.
203. Li, W., et al., *Suppressing H19 Modulates Tumorigenicity and Stemness in U251 and U87MG Glioma Cells*. *Cell Mol Neurobiol*, 2016. **36**(8): p. 1219-1227.
204. Zhang, T., et al., *LncRNA H19 is overexpressed in glioma tissue, is negatively associated with patient survival, and promotes tumor growth through its derivative miR-675*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016. **20**: p. 4891-4897.
205. Li, C., et al., *H19 derived microRNA-675 regulates cell proliferation and migration through CDK6 in glioma*. *Am J Transl Res*, 2015. **7**(10): p. 1747-64.
206. Zhao, H., et al., *The lncRNA H19 interacts with miR-140 to modulate glioma growth by targeting iASPP*. *Arch Biochem Biophys*, 2016. **610**: p. 1-7.
207. Chen, L., et al., *Long non-coding RNA H19 promotes proliferation and invasion in human glioma cells by downregulating miR-152*. *Oncol Res*, 2018: p. 1419–1428.
208. Jia, P., et al., *Long non-coding RNA H19 regulates glioma angiogenesis and the biological behavior of glioma-associated endothelial cells by inhibiting microRNA-29a*. *Cancer Lett*, 2016. **381**(2): p. 359-69.
209. Danenberg, P.V., et al., *Thymidylate synthetase - a target enzyme in cancer chemotherapy*. *Biochim Biophys Acta*, 1977. **473**: p. 73–92.
210. Chen, W., et al., *MALAT1 is a prognostic factor in glioblastoma multiforme and induces chemoresistance to temozolomide through suppressing miR-203 and promoting thymidylate synthase expression*. *Oncotarget*, 2017: p. 22783-22799.

211. Cai, T., et al., *Long noncoding RNA MALAT1 knockdown reverses chemoresistance to temozolomide via promoting microRNA-101 in glioblastoma*. Cancer Med, 2018. **7**(4): p. 1404-1415.
212. Huang, F., et al., *MicroRNA-101 Inhibits Cell Proliferation, Invasion, and Promotes Apoptosis by Regulating Cyclooxygenase-2 in Hela Cervical Carcinoma Cells*. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2013. **14**(10): p. 5915-5920.
213. Ma, K.X., et al., *Long noncoding RNA MALAT1 associates with the malignant status and poor prognosis in glioma*. Tumour Biol, 2015. **36**(5): p. 3355-9.
214. Li, H., et al., *Long Non-Coding RNA MALAT1 Decreases the Sensitivity of Resistant Glioblastoma Cell Lines to Temozolomide*. Cell Physiol Biochem, 2017. **42**(3): p. 1192-1201.
215. Cheng, Z., et al., *Long Non-coding RNA XIST Promotes Glioma Tumorigenicity and Angiogenesis by Acting as a Molecular Sponge of miR-429*. J Cancer, 2017. **8**(19): p. 4106-4116.
216. Yao, Y., et al., *Knockdown of long non-coding RNA XIST exerts tumor-suppressive functions in human glioblastoma stem cells by up-regulating miR-152*. Cancer Lett, 2015. **359**(1): p. 75-86.
217. Wang, Z., et al., *Long non-coding RNA XIST exerts oncogenic functions in human glioma by targeting miR-137*. Am. J. Transl. Res., 2017. **9**: p. 1845–1855.
218. Zheng, J., et al., *CRNDE Promotes Malignant Progression of Glioma by Attenuating miR-384/PIWIL4/STAT3 Axis*. Mol Ther, 2016. **24**(7): p. 1199-215.
219. Li, D.X., et al., *The long non-coding RNA CRNDE acts as a ceRNA and promotes glioma malignancy by preventing miR-136-5p-mediated downregulation of Bcl-2 and Wnt2*. Oncotarget, 2017. **8**: p. 88163–88178.
220. Yu, H., et al., *Knockdown of long non-coding RNA XIST increases blood–tumor barrier permeability and inhibits glioma angiogenesis by targeting miR-137*. Oncogenesis, 2017. **6**(3): p. e303-e303.
221. Lang, H.L., et al., *Glioma cells promote angiogenesis through the release of exosomes containing long non-coding RNA POU3F3*. Eur. Rev. Med. Pharmacol., 2017. **21**: p. 959–972.
222. Guo, H., et al., *Functional linc-POU3F3 is overexpressed and contributes to tumorigenesis in glioma*. Gene, 2015. **554**(1): p. 114-9.
223. Luo, G., et al., *Long Non-Coding RNA MEG3 Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Prostate Cancer*. Cell Physiol Biochem, 2015. **37**(6): p. 2209-20.
224. Vecera, M., et al., *Long Non-Coding RNAs in Gliomas: From Molecular Pathology to Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Targets*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(9): p. 1-15.
225. Zhou, Y., et al., *MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor*. J Mol Endocrinol, 2012. **48**(3): p. R45-53.
226. Zhang, S., et al., *Long noncoding RNA MEG3 suppresses the growth of glioma cells by regulating the miR965p/MTSS1 signaling pathway*. Mol Med Rep, 2019. **20**(5): p. 4215-4225.
227. Li, K., et al., *Natural Antisense Transcript- A Concomitant Engagement with Protein-Coding Transcript*. Oncotarget, 2010. **1**: p. 447–452.
228. Werner, A., et al., *Biological functions of natural antisense transcripts*. BMC Biol., 2013. **11**: p. 31.
229. Villegas, V.E., et al., *Neighboring gene regulation by antisense long non-coding RNAs*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(2): p. 3251-66.

230. Baumann, P., et al., *Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair*. TIBS, 1998. **23**: p. 247-251.
231. Shinohara, A., et al., *Homologous recombination and the roles of double-strand breaks*. TIBS, 1995. **20**: p. 387-391.
232. King, H.O., et al., *RAD51 Is a Selective DNA Repair Target to Radiosensitize Glioma Stem Cells*. Stem Cell Reports, 2017. **8**(1): p. 125-139.
233. Short, S.C., et al., *Rad51 inhibition is an effective means of targeting DNA repair in glioma models and CD133+ tumor-derived cells*. Neuro Oncol, 2011. **13**(5): p. 487-99.
234. Quiros, S., et al., *Rad51 and BRCA2--New molecular targets for sensitizing glioma cells to alkylating anticancer drugs*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27183.
235. Stojcheva, N., et al., *MicroRNA-138 promotes acquired alkylator resistance in glioblastoma by targeting the Bcl-2-interacting mediator BIM*. Oncotarget, 2016. **7**: p. 12937-12950.
236. Tilghman, J., et al., *HMMR maintains the stemness and tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells*. Cancer Res, 2014. **74**(11): p. 3168-79.
237. Yang, J.X., et al., *Long non-coding RNA homeobox (HOX) A11-AS promotes malignant progression of glioma by targeting miR-124-3p*. Neoplasia, 2018. **65**(4): p. 505-514.
238. Li, J., et al., *Targeting Long Noncoding RNA HMMR-AS1 Suppresses and Radiosensitizes Glioblastoma*. Neoplasia, 2018. **20**(5): p. 456-466.
239. Livak, K.J., et al., *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
240. Cerami, E., et al., *The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data*. Cancer Discov, 2012. **2**(5): p. 401-4.
241. Gao, J., et al., *Collection, integration and analysis of cancer genomic profiles: from data to insight*. Curr Opin Genet Dev, 2014. **24**: p. 92-8.
242. Ceccarelli, M., et al., *Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma*. Cell, 2016. **164**(3): p. 550-63.
243. Raderschall, E., et al., *Elevated Levels of Rad51 Recombination Protein in Tumor Cells*. Cancer Res, 2002. **62**: p. 219-225.
244. Happold, C., et al., *Distinct molecular mechanisms of acquired resistance to temozolomide in glioblastoma cells*. J Neurochem, 2012. **122**(2): p. 444-55.
245. Li, J., et al., *TANRIC: An Interactive Open Platform to Explore the Function of lncRNAs in Cancer*. Cancer Res, 2015. **75**(18): p. 3728-37.
246. Xu, J.Z., et al., *Antisense RNA: the new favorite in genetic research*. J Zhejiang Univ Sci B, 2018. **19**(10): p. 739-749.
247. Gagnon, K.T., et al., *Analysis of nuclear RNA interference in human cells by subcellular fractionation and Argonaute loading*. Nat Protoc, 2014. **9**(9): p. 2045-60.
248. Lennox, K.A., et al., *Cellular localization of long non-coding RNAs affects silencing by RNAi more than by antisense oligonucleotides*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(2): p. 863-77.
249. Vickers, T.A., et al., *Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 7108-18.
250. Zeng Y., et al., *RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasmic RNA*, 2002. **8**: p. 855-860.

251. Roos, W.P., et al., *XRCC3 contributes to temozolomide resistance of glioblastoma cells by promoting DNA double-strand break repair*. Cancer Lett, 2018. **424**: p. 119-126.
252. Scully, R., et al., *Association of BRCA1 with Rad51 in Mitotic and Meiotic Cells*. Cell, 1997. **88**: p. 265-275.
253. Arias-Lopez, C., et al., *p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene*. EMBO Rep, 2006. **7**(2): p. 219-24.
254. Suwaki, N., et al., *RAD51 paralogs: roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis*. Semin Cell Dev Biol, 2011. **22**(8): p. 898-905.
255. Stürzbecher, H.W., et al., *p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51:RecA protein interaction*. The EMBO Journal, 1996. **15**: p. 1992-2000.
256. Altmann, T., et al., *DNA ligase IV syndrome; a review*. Orphanet J Rare Dis, 2016. **11**(1): p. 137.
257. Zhou, T., et al., *Potential relationship between inadequate response to DNA damage and development of myelodysplastic syndrome*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(1): p. 966-89.
258. Chrzanowska, K.H., et al., *Nijmegen breakage syndrome (NBS)*. Orphanet J Rare Dis, 2012. **7**: p. 13.
259. O'Driscoll, M., et al., *The role of double-strand break repair - insights from human genetics*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(1): p. 45-54.
260. Richardson, C., et al., *Rad51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability*. Oncogene, 2004. **23**(2): p. 546-53.
261. Lim, D.S., et al., *A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53*. Mol Cell Biol, 1996. **16**: p. 7133-7143.
262. Tsuzuki, T., et al., *Targeted disruption of the RAD51 gene leads to lethality in embryonic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**: p. 6236-6240.
263. Gachechiladze, M., et al., *RAD51 as a potential surrogate marker for DNA repair capacity in solid malignancies*. Int J Cancer, 2017. **141**(7): p. 1286-1294.
264. Takata, M., et al., *The Rad51 Paralog Rad51B Promotes Homologous Recombinational Repair*. Mol Cell Biol, 2000. **20**: p. 6476-6482.
265. Takata, M., et al., *Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(8): p. 2858-66.
266. Dosanjh, M.K., et al., *Isolation and characterization of RAD51C, a new human member of the RAD51 family of related genes*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**: p. 1179-1184.
267. Lin, Z., et al., *Origins and evolution of the recA/RAD51 gene family: evidence for ancient gene duplication and endosymbiotic gene transfer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(27): p. 10328-10333.
268. Maacke, H., et al., *Overexpression of wild-type RAD51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer*. Int J Cancer, 2000. **88**: p. 907-913.
269. Wiegman, A.P., et al., *Rad51 supports triple negative breast cancer metastasis*. Oncotarget, 2014. **5**: p. 3261-3272.
270. Xu, Z.Y., et al., *Xrcc3 induces cisplatin resistance by stimulation of Rad51-related recombinational repair, S-phase checkpoint activation, and reduced apoptosis*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **314**(2): p. 495-505.

271. Qiao, G.B., et al., *High-level expression of Rad51 is an independent prognostic marker of survival in non-small-cell lung cancer patients*. Br J Cancer, 2005. **93**(1): p. 137-43.
272. Birkelbach, M., et al., *Detection of impaired homologous recombination repair in NSCLC cells and tissues*. J Thorac Oncol, 2013. **8**(3): p. 279-86.
273. Chen, Q., et al., *The homologous recombination protein RAD51 is a promising therapeutic target for cervical carcinoma*. Oncol Rep, 2017. **38**(2): p. 767-774.
274. Winsex, S.L., et al., *A Variant within the DNA Repair Gene XRCC3 Is Associated with the Development of Melanoma Skin Cancer*. Cancer Res, 2000. **60**: p. 5612-5616.
275. Han, J., et al., *Polymorphisms in DNA Double-Strand Break Repair Genes and Skin Cancer Risk*. Cancer Res, 2004. **64**: p. 3009-3013.
276. Nowacka-Zawisza, M., et al., *RAD51 and XRCC3 Polymorphisms Are Associated with Increased Risk of Prostate Cancer*. J Oncol, 2019. **2019**: p. 2976373.
277. Collis, S.J., et al., *Ribozyme minigene-mediated RAD51 down-regulation increases radiosensitivity of human prostate cancer cells*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**: p. 1534-1538.
278. Pierce, A.J., et al., *XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells* Genes & Development, 1999. **13**: p. 2633-2638.
279. Bishop, D.K., et al., *Xrcc3 Is Required for Assembly of Rad51 Complexes in Vivo*. The Journal of biological chemistry, 1998. **273**: p. 21482-21488.
280. Somyajit, K., et al., *ATM- and ATR-mediated phosphorylation of XRCC3 regulates DNA double-strand break-induced checkpoint activation and repair*. Mol Cell Biol, 2013. **33**(9): p. 1830-44.
281. Ohnishi, T., et al., *In Vitro and in Vivo Potentiation of Radiosensitivity of Malignant Gliomas by Antisense Inhibition of the RAD51 Gene*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **245**: p. 319-324.
282. Taki, T., et al., *Antisense Inhibition of the RAD51 Enhances Radiosensitivity*. Biochem Biophys Res Commun, 1996: p. 434-438.
283. Akiyama, Y., et al., *Hyaluronate receptors mediating glioma cell migration and proliferation*. J Neurooncol, 2001. **53**: p. 115–127.
284. Wang, C., et al., *The overexpression of RHAMM, a hyaluronan-binding protein that regulates ras signaling, correlates with overexpression of mitogen-activated protein kinase and is a significant parameter in breast cancer progression*. Clin Cancer Res, 1998. **4**: p. 567-576.
285. Mele, V., et al., *The hyaluronan-mediated motility receptor RHAMM promotes growth, invasiveness and dissemination of colorectal cancer*. Oncotarget, 2017. **8**: p. 70617-70629.
286. Li, Q., et al., *Over-expressed lncRNA HOTAIRM1 promotes tumor growth and invasion through up-regulating HOXA1 and sequestering G9a/EZH2/Dnmts away from the HOXA1 gene in glioblastoma multiforme*. J Exp Clin Cancer Res, 2018. **37**(1): p. 265.
287. Lappin, T.R.J., et al., *HOX GENES- Seductive Science, Mysterious Mechanisms*. Ulster Med J, 2006. **75**: p. 23-31.
288. Li, B., et al., *The Role of HOX Transcription Factors in Cancer Predisposition and Progression*. Cancers (Basel), 2019. **11**(4): p. 1-25.
289. Wang, Q., et al., *A novel cell cycle-associated lncRNA, HOXA11-AS, is transcribed from the 5-prime end of the HOXA transcript and is a biomarker of progression in glioma*. Cancer Lett, 2016. **373**(2): p. 251-9.

290. Xu, C., et al., *Regulation of HOXA11-AS/miR-214-3p/EZH2 axis on the growth, migration and invasion of glioma cells*. Biomed & Pharmacot, 2017. **95**: p. 1504-1513.
291. Xu, L.M., et al., *Over-expression of the long non-coding RNA HOTTIP inhibits glioma cell growth by BRE*. J Exp Clin Cancer Res, 2016. **35**(1): p. 162.
292. Gazy, I., et al., *TODRA, a lncRNA at the RAD51 Locus, Is Oppositely Regulated to RAD51, and Enhances RAD51-Dependent DSB (Double Strand Break) Repair*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0134120.
293. Iwanaga, R., et al., *Differential regulation of expression of the mammalian DNA repair genes by growth stimulation*. Oncogene, 2004. **23**(53): p. 8581-90.
294. Bindra, R.S., et al., *Repression of RAD51 gene expression by E2F4/p130 complexes in hypoxia*. Oncogene, 2007. **26**(14): p. 2048-57.
295. Wu, M., et al., *Dynamic regulation of Rad51 by E2F1 and p53 in prostate cancer cells upon drug-induced DNA damage under hypoxia*. Mol Pharmacol, 2014. **85**(6): p. 866-76.
296. Wu, L., et al., *The E2F1±3 transcription factors are essential for cellular proliferation*. Nature, 2001. **414**: p. 457-462.
297. Stanelle, J., et al., *Gene expression changes in response to E2F1 activation* Kopie. Nucleic Acids Res, 2002. **30**: p. 1859-1867.
298. Zhang, X., et al., *E2F1-regulated long non-coding RNA RAD51-AS1 promotes cell cycle progression, inhibits apoptosis and predicts poor prognosis in epithelial ovarian cancer*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 4469.
299. Hahnen, E., et al., *Genanalysen in der Gynäkologie: Basis für die personalisierte Prävention und Therapie*. Dtsch Arztebl , 2016. **133**: p. 11.
300. Meister, G., et al., *Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA*. Nature, 2004. **431**: p. 343-349.
301. Dana, H., et al., *Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA*. Int J Biomed Sci, 2017. **13**: p. 48-57.
302. Meister, G., et al., *Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs*. Mol Cell, 2004. **15**(2): p. 185-97.
303. Siomi, H. et al., *On the road to reading the RNA-interference code*. Nature, 2009. **457**(7228): p. 396-404.
304. Tomari, Y., et al., *Perspective: machines for RNAi*. Genes Dev, 2005. **19**(5): p. 517-29.
305. Bernstein, E., et al., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. Nature, 2001. **409**: p. 363-366.
306. MacRae, I.J., et al., *In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(2): p. 512-7.
307. Gregory, R.I., et al., *Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing*. Cell, 2005. **123**(4): p. 631-40.
308. Valencia-Sanchez, M.A., et al., *Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs*. Genes Dev, 2006. **20**(5): p. 515-24.
309. Jinek, M., et al., *A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference*. Nature, 2009. **457**(7228): p. 405-12.
310. Ding, S.W., et al., *Antiviral immunity directed by small RNAs*. Cell, 2007. **130**(3): p. 413-26.
311. Waterhouse, P.M., et al., *Gene silencing as an adaptive defence against viruses*. Nature, 2001. **411**: p. 834-842.
312. Ito, H., *Small RNAs and transposon silencing in plants*. Dev Growth Differ, 2012. **54**(1): p. 100-7.

313. Xu, C.-F., et al., *Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy*. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. **10**(1): p. 1-12.
314. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21±nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells* Nature, 2001. **411**: p. 494-498.
315. Caplen, N.J., et al., *Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9742-7.
316. Ryther, R.C., et al., *siRNA therapeutics: big potential from small RNAs*. Gene Ther, 2005. **12**(1): p. 5-11.
317. Akhtar, S., et al., *Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo*. J Clin Invest, 2007. **117**(12): p. 3623-32.
318. Haasnoot, J., et al., *RNA interference against viruses- strike and counterstrike*. Nat Biotechnol, 2007. **25**: p. 1435-1443.
319. Melton, D.A., et al., *Injected anti-sense RNAs specifically block messenger RNA translation in vivo*. Proc Natl Acad Sci U SA, 1984. **82**: p. 144-148.
320. Stephenson, M.L., et al., *Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide*. Proc Natl Acad Sci U SA, 1978. **75**: p. 285-288.
321. Fire, A.Z., et al., *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006*. Nobel Media AB 2020 24.01.2020 [cited 2006; Available from: NobelPrize.org.]
322. Jackson, A.L., et al., *Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi*. Nature, 2003. **21**: p. 635-638.
323. Scacheri, P.C., et al., *Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 1892-7.
324. Haley, B., et al., *Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(7): p. 599-606.
325. Wienholds, E., et al., *MicroRNA function in animal development*. FEBS Lett, 2005. **579**(26): p. 5911-22.
326. Lewis, B.P., et al., *Prediction of Mammalian MicroRNA Targets*. Cell, 2003. **115**: p. 787-798.
327. Kehl, T., et al., *About miRNAs, miRNA seeds, target genes and target pathways*. Oncotarget, 2017. **8**: p. 107167-107175.
328. Doench, J.G., et al., *siRNAs can function as miRNAs*. Genes Dev, 2003. **17**(4): p. 438-42.
329. Birmingham, A., et al., *3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets*. Nat Methods, 2006. **3**(3): p. 199-204.
330. Hannus, M., et al., *siPools: highly complex but accurately defined siRNA pools eliminate off-target effects*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(12): p. 8049-61.
331. Jackson, A.L., et al., *Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity*. RNA, 2006. **12**(7): p. 1179-87.
332. Semizarov, D., et al., *Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(11): p. 6347-52.
333. Caffrey, D.R., et al., *siRNA off-target effects can be reduced at concentrations that match their individual potency*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21503.
334. Persengiev, S.P., et al., *Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs)*. RNA, 2004. **10**(1): p. 12-18.

335. Krueger, U., et al., *Insights into effective RNAi gained from large-scale siRNA validation screening*. Oligonucleotides, 2007. **17**(2): p. 237-50.
336. Kim, D.H., et al., *Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(2): p. 222-6.
337. Wu, H., et al., *Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 17181-9.
338. Liang, X.H., et al., *RNase H1-Dependent Antisense Oligonucleotides Are Robustly Active in Directing RNA Cleavage in Both the Cytoplasm and the Nucleus*. Mol Ther, 2017. **25**(9): p. 2075-2092.
339. Lennox, K.A., et al., *Mini-review- Current strategies to knockdown long non-coding RNAs*. J Rare Dis Res Treat. , 2016. **3**: p. 66-70.
340. Gilbert, L.A., et al., *CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes*. Cell, 2013. **154**(2): p. 442-51.
341. Rose, S.D., et al., *Optimizing knockdown of gene expression using the TriFECTa™ Dicer-substrate RNAi reagent system*. Nature Met, 2006. **3**(9): p. V-VII.
342. *RNA Functional Analysis – enhanced by LNA*. RNA Functional Analysis, 2018: p. 2-20.
343. Adriaens, C., et al., *p53 induces formation of NEAT1 lncRNA-containing paraspeckles that modulate replication stress response and chemosensitivity*. Nat Med, 2016. **22**(8): p. 861-8.
344. Townsend, M.H., et al., *Examination of Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase as a biomarker for colorectal cancer patients*. Mol Cell Oncol, 2018. **5**(4): p. e1481810.
345. Wu, X., et al., *Selective sequestration of STAT1 in the cytoplasm via phosphorylated SHP-2 ameliorates murine experimental colitis*. J Immunol, 2012. **189**(7): p. 3497-507.
346. Bayfield, M.A., et al., *Conservation of a masked nuclear export activity of La proteins and its effects on tRNA maturation*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(9): p. 3303-12.
347. Dreyfuss, D., et al., *HnRNP proteins and the biogenesis of mRNA* Annu Rev Biochem, 1993. **62**: p. 289-321.
348. Van Heesch, S., et al., *Extensive localization of long noncoding RNAs to the cytosol and mono- and polyribosomal complexes*. Genome Biology 2014. **15**: p. R6.
349. Dong, P., et al., *Long Non-coding RNA NEAT1: A Novel Target for Diagnosis and Therapy in Human Tumors*. Front Genet, 2018. **9**: p. 471.
350. Jackson, A.L., et al., *Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing*. RNA, 2006. **12**(7): p. 1197-205.
351. Guo, P., et al., *Engineering RNA for targeted siRNA delivery and medical application*. Adv Drug Deliv Rev, 2010. **62**(6): p. 650-66.
352. Soutchek, J., et al., *Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs*. Nature, 2004. **432**: p. 173-178.
353. Mahmoodi Chalbati, G., et al., *Small interfering RNAs (siRNAs) in cancer therapy: a nano-based approach*. Int J Nanomedicine, 2019. **14**: p. 3111-3128.
354. Kanasty, R.L., et al., *Action and reaction: the biological response to siRNA and its delivery vehicles*. Mol Ther, 2012. **20**(3): p. 513-24.
355. Chernikov, I.V., et al., *Current Development of siRNA Bioconjugates: From Research to the Clinic*. Front Pharmacol, 2019. **10**: p. 444.

356. Juliano, R., et al., *Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(12): p. 4158-71.
357. Zheng, X., et al., *A novel in vivo siRNA delivery system specifically targeting dendritic cells and silencing CD40 genes for immunomodulation*. Blood, 2009. **113**(12): p. 2646-54.
358. Landen, C.N., Jr., et al., *Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery*. Cancer Res, 2005. **65**(15): p. 6910-8.
359. Tai, W., *Current Aspects of siRNA Bioconjugate for In Vitro and In Vivo Delivery*. Molecules, 2019. **24**(12). :p. 1-25.
360. Santel, A., et al., *RNA interference in the mouse vascular endothelium by systemic administration of siRNA-lipoplexes for cancer therapy*. Gene Ther, 2006. **13**(18): p. 1360-70.
361. Schiffelers, R.M., et al., *Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(19): p. e149.
362. Dorsett, Y., et al., *siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(4): p. 318-29.
363. Li, M., et al., *Induction of RNA Interference in Dendritic Cells*. Imm. res., 2004. **30**: p. 215-230.
364. Huang, Y., et al., *Elimination pathways of systemically delivered siRNA*. Mol Ther, 2011. **19**(2): p. 381-5.
365. Shen, J., et al., *Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1*. Gene Ther, 2006. **13**(3): p. 225-34.
366. Kandil, R., et al., *Pulmonary delivery of siRNA as a novel treatment for lung diseases*. Ther.Deliv, 2019. **10**: p. 203.206.
367. Marques, J.T., et al., *Activation of the mammalian immune system by siRNAs*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(11): p. 1399-405.
368. Mansoori, B., et al., *Mechanisms of immune system activation in mammals by small interfering RNA (siRNA)*. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2016. **44**(7): p. 1589-96.
369. Behlke, M.A., *Chemical modification of siRNAs for in vivo use*. Oligonucleotides, 2008. **18**(4): p. 305-19.
370. Chen, C., et al., *Chemical modifications of nucleic acid drugs and their delivery systems for gene-based therapy*. Med Res Rev, 2018. **38**(3): p. 829-869.
371. Benizri, S., et al., *Bioconjugated Oligonucleotides: Recent Developments and Therapeutic Applications*. Bioconjug Chem, 2019. **30**(2): p. 366-383.
372. Chakraborty, C., et al., *Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine*. Mol Ther Nucleic Acids, 2017. **8**: p. 132-143.
373. Benson, M.D., et al., *Inotersen Treatment for Patients with Hereditary Transthyretin Amyloidosis*. N Engl J Med, 2018. **379**(1): p. 22-31.
374. Golan, T., et al., *RNAi therapy targeting KRAS in combination with chemotherapy for locally advanced pancreatic cancer patients*. Oncotarget, 2015. **6**: p. 24560-24570.
375. Yamakawa, K., et al., *Development and Clinical Trials of Nucleic Acid Medicines for Pancreatic Cancer Treatment*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(17): p. 1-13.
376. Demeure, M.J., et al., *A phase I/II study of TKM-080301, a PLK1-targeted RNAi in patients with adrenocortical cancer (ACC)*. Jour of clin onc. **34**: p. 2547-2547.

377. Tolcher, A.W., et al., *Safety and activity of DCR-MYC, a first-in-class Dicer-substrate small interfering RNA (DsiRNA) targeting MYC, in a phase I study in patients with advanced solid tumors*. Jour of clin onc. **33**: p. 11006-11006.
378. Raman, M., et al., *Systematic proteomics of the VCP-UBXD adaptor network identifies a role for UBXN10 in regulating ciliogenesis*. Nat Cell Biol, 2015. **17**(10): p. 1356-69.
379. Menzl, I., et al., *Loss of primary cilia occurs early in breast cancer development*. Cilia, 2014. **3**: p. 3-7.
380. Seeley, E.S., et al., *Pancreatic cancer and precursor pancreatic intraepithelial neoplasia lesions are devoid of primary cilia*. Cancer Res, 2009. **69**(2): p. 422-30.
381. Schraml, P., et al., *Sporadic clear cell renal cell carcinoma but not the papillary type is characterized by severely reduced frequency of primary cilia*. Mod Pathol, 2009. **22**(1): p. 31-6.
382. Ravasi, T., et al., *Experimental validation of the regulated expression of large numbers of non-coding RNAs from the mouse genome*. Genome Res, 2006. **16**(1): p. 11-9.
383. Nagaoka, K., et al., *CPEB1 mediates epithelial-to-mesenchyme transition and breast cancer metastasis*. Oncogene, 2016. **35**(22): p. 2893-901.
384. Xu, M., et al., *CPEB1 mediates hepatocellular carcinoma cancer stemness and chemoresistance*. Cell Death Dis, 2018. **9**(10): p. 957.
385. Tordjman, J., et al., *Tumor suppressor role of cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2 (CPEB2) in human mammary epithelial cells*. BMC Cancer, 2019. **19**(1): p. 561.
386. Galardi, S., et al., *CPEB1 restrains proliferation of Glioblastoma cells through the regulation of p27(Kip1) mRNA translation*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 25219.
387. Yin, J., et al., *CPEB1 modulates differentiation of glioma stem cells via downregulation of HES1 and SIRT1 expression* Oncotarget, 2014. **5**: p. 6756-6769.
388. Sorokin, A.V., et al., *Aberrant Expression of proPTPRN2 in Cancer Cells Confers Resistance to Apoptosis*. Cancer Res, 2015. **75**(9): p. 1846-58.
389. Yang, J., et al., *eIF4B phosphorylation by pim kinases plays a critical role in cellular transformation by Abl oncogenes*. Cancer Res, 2013. **73**(15): p. 4898-908.
390. Madden, J.M., et al., *Abrogating phosphorylation of eIF4B is required for EGFR and mTOR inhibitor synergy in triple-negative breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2014. **147**(2): p. 283-93.
391. Shahbazian, D., et al., *eIF4B controls survival and proliferation and is regulated by proto-oncogenic signaling pathways*. Cell Cycle, 2010. **9**(20): p. 4106-9.
392. Nakashima, Y., et al., *Molecular cloning and characterization of a human brain ryanodine receptor*. FEBS Lett, 1997. **417**: p. 157-162.
393. Pan, Y., et al., *A robust two-gene signature for glioblastoma survival prediction*. J Cell Biochem, 2020: p. 1-13.
394. Liu, J., et al., *TMEM106A inhibits cell proliferation, migration, and induces apoptosis of lung cancer cells*. J Cell Biochem, 2018: p. 7825-7833.
395. Blasius, M., et al., *ATM targets hnRNPK to control p53*. Cell Cycle, 2013. **12**(6): p. 698–704.
396. Moumen, A., et al., *hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage*. Cell, 2005. **123**(6): p. 1065-78.
397. Ziv-Av, A., et al., *RTVP-1 regulates glioma cell migration and invasion via interaction with N-WASP and hnRNPK*. Oncotarget, 2015. **6**: p. 19826-19840.

- 398. Derrien, T., et al., *The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression*. Genome Res, 2012. **22**(9): p. 1775-89.
- 399. Chen, F.C., et al., *Functional Implications of RNA Splicing for Human Long Intergenic Noncoding RNAs*. Evol Bioinform Online, 2014. **10**: p. 219-28.
- 400. Krchnakova, Z., et al., *Splicing of long non-coding RNAs primarily depends on polypyrimidine tract and 5' splice-site sequences due to weak interactions with SR proteins*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(2): p. 911-928.
- 401. Kiegle, E.A., et al., *A Genomic View of Alternative Splicing of Long Non-coding RNAs during Rice Seed Development Reveals Extensive Splicing and lncRNA Gene Families*. Front Plant Sci, 2018. **9**: p. 115.
- 402. Peng, Z., et al., *New insights into long noncoding RNAs and their roles in glioma*. Mol Cancer, 2018. **17**(1): p. 61.
- 403. Deveson, I.W., et al., *The Dimensions, Dynamics, and Relevance of the Mammalian Noncoding Transcriptome*. Trends Genet, 2017. **33**(7): p. 464-478.
- 404. Pramoonjago, P., et al., *Knockdown of Sox4 expression by RNAi induces apoptosis in ACC3 cells*. Oncogene, 2006. **25**(41): p. 5626-39.
- 405. Li, R., et al., *Long noncoding RNA profiles reveal three molecular subtypes in glioma*. CNS Neurosci Ther, 2014. **20**(4): p. 339-43.
- 406. Zhang, X.Q., et al., *A long non-coding RNA signature in glioblastoma multiforme predicts survival*. Neurobiol Dis, 2013. **58**: p. 123-31.

6. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir mein Studium und die Vollendung meiner Promotion ermöglicht haben:

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Guido Reifenberger bedanken, für die Möglichkeit am Institut für Neuropathologie meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen und für all die Unterstützung und das konstruktive Feedback.

Weiterhin möchte ich mich sehr bei Frau Dr. Marietta Wolter und Herrn Dr. Bastian Malzkorn für die interessante Promotionsthematik und für die großartige Unterstützung bei dieser Arbeit bedanken. Danke für ein offenes Ohr, sämtliche Anregungen, die fantastische Motivation und die vielen gemeinsamen Stunden im Labor. Es war mir eine große Freude und Ehre in Eurem Team mitarbeiten zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Michael Sabel danke ich für die Möglichkeit, dass ich 2015/2016 als wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf Glioblastompatient/innen und Ihre Angehörigen mit betreuen durfte. Diese Arbeit hat mich in vielerlei Hinsicht geformt und der Wunsch, mehr für diese Patienten tun zu können, hat mich unter anderem zu dieser Dissertation gebracht.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Jörg Felsberg für die Bereitstellung sämtlicher Informationen über die Glioblastomtumormproben aus der ZNS-Tumorbank Düsseldorf danken.

Frau Dr. Kerstin Kaulich, Frau Dr. Angela Zacher und Herrn Dr. Sascha Steltgens danke ich für die wunderbare Zusammenarbeit und sämtliche Unterstützung im Labor.

Des weiteren danke ich Herrn Daniel Picard für die Bereitstellung der bioinformatischen Auswertung der Expression von differentiell exprimierten lncRNAs.

Herrn Prof. Dr. Michael Weller, Frau Dr. Monika Hegi, Herrn Prof. V.P. Collins und Frau Prof. Dr. Katrin Lamszus danke ich für die Bereitstellung von Glioblastomzelllinien.

Frau Dipl. Ing. Katharina Raba danke ich für die Möglichkeit, am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika durchflusszytometrische Untersuchungen durchführen zu können.

Und zum Schluss möchte ich auch meinen Eltern und Geschwistern danken, die mir dieses Studium ermöglicht haben und mich jeden Tag aufs Neue bei all meinen Zielen unterstützen.

Ein großes Dankeschön geht außerdem an meine engsten Freunde – Danke für all die Motivation, den Zuspruch und die großartigen Freundschaften über so viele Jahre!