

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

**Die Rolle von microRNAs in der Regulation der Expression
von O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)
in Glioblastomen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Anna Isabelle Aurélie Stetter

2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Guido Reifenberger

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Michael Sabel

Für meine Eltern

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Poster auf der gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie und der Deutschen Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie am 22.-24.6.2017 in Erlangen präsentiert und als *Abstract* veröffentlicht in:

Stetter I, Rautenberg C, Wolter M, Reifenberger G, Malzkorn B. Identification of miRNAs regulating MGMT expression in promoter-unmethylated glioblastomas. *Der Pathologe* 38, Supplement Issue 1, Seite 1-147, 2017

Zusammenfassung

Das Glioblastom ist mit einer mittleren Überlebenszeit von 14-16 Monaten und einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 5 % der bösartigste primäre Hirntumor. Der heutzutage wichtigste prognostische und prädiktive Biomarker für Glioblastompatienten ist der DNA-Methylierungsstatus des Promotors des Gens für das DNA-Reparaturprotein O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT). MGMT ist in der Lage, die durch Temozolomid, das wichtigste Chemotherapeutikum in der Therapie des Glioblastoms, verursachte zytotoxische Methylierung der DNA an der O⁶-Position des Guanins zu reparieren. Dadurch erhöht es die Resistenz der Tumorzellen gegenüber der Chemotherapie mit Temozolomid. Eine niedrige MGMT-Expression ist daher besser für das Ansprechen von Glioblastomen auf Temozolomid und prognostisch günstig für die Patienten. Die Höhe der MGMT-Expression im Tumorgewebe ist insbesondere vom DNA-Methylierungsstatus im Bereich des *MGMT*-Genpromotors abhängig. Hierbei bedeutet ein methylierter *MGMT*-Promotor eine niedrige MGMT-Expression in den Tumorzellen und somit ein besseres Therapieansprechen. Allerdings gibt es unter den Glioblastomen ohne *MGMT*-Promotormethylierung ebenfalls eine Fraktion von Tumoren mit einer niedrigen MGMT-Expression, sodass es weitere Einflussfaktoren auf die Regulation der MGMT-Expression in Glioblastomzellen geben muss. Es hat sich gezeigt, dass kleine, nicht-kodierende RNAs, d.h. microRNAs (miRNAs), wichtige Regulatoren der Genexpression auf epigenetischer und posttranskriptioneller Ebene darstellen. Die vorliegende Dissertationsarbeit geht der Frage nach, ob bestimmte miRNAs zu einer verminderten MGMT-Expression in einem Teil der Glioblastome ohne *MGMT*-Promotormethylierung beitragen können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hierfür zwei verschiedene Glioblastomzelllinien mit fünf potenziell MGMT-regulierenden miRNAs transient transfiziert. Nachfolgend wurde die MGMT-Expression auf Transkript- und Proteinebene untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass die Transfektion von *hsa-miR-149-3p* die MGMT-Expression in den beiden Glioblastomzelllinien im Vergleich zur Transfektion von Kontroll-miRNA signifikant reduziert. Mittels eines Luciferase-Reportergen-Assays konnte eine direkte Bindung von *hsa-miR-149-3p* an die 3'-UTR des *MGMT*-Transkriptes nachgewiesen werden. Eine Sensitivierung der Glioblastomzellen gegenüber einer Temozolomidbehandlung nach Überexpression von *hsa-miR-149-3p* war dagegen nicht nachzuweisen. Allerdings fand sich ein pro-apoptotischer Effekt der Überexpression von *hsa-miR-149-3p* in Glioblastomzellen. Insgesamt sprechen die eigenen Befunde in Übereinstimmung mit Literaturdaten anderer Arbeitsgruppen dafür, dass bestimmte miRNAs, darunter *hsa-miR-149-3p*, einen Einfluss auf die MGMT-Expression in Glioblastomen haben, gleichzeitig aber auch MGMT-unabhängige Effekte auf das Tumorwachstum ausüben können.

Abstract

Glioblastoma is the most malignant primary brain tumor, with a mean survival time of 14-16 months and a 5-year survival rate of less than 5 %. The most important prognostic and predictive biomarker for glioblastoma patients today is the DNA methylation status in the promoter of the gene for the DNA repair protein O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT). MGMT is able to repair the cytotoxic alkylation of the DNA at the O6-position of guanine caused by temozolomide, the most important chemotherapeutic agent in the therapy of glioblastoma. Thereby, MGMT increases the resistance of the tumor cells to chemotherapy with temozolomide. A low MGMT expression is therefore better for the response of glioblastomas to temozolomide and associates with a more favorable prognosis of the patients. The level of MGMT expression in the tumor tissue is particularly dependent on the DNA methylation status in the area of the *MGMT* gene promoter. A methylated *MGMT* promoter results in a low MGMT expression in the tumor cells and thus a better response to therapy. However, among the glioblastomas without *MGMT* promoter methylation there is also a fraction of tumors with low MGMT expression, so that there must be further factors modulating the regulation of MGMT expression in glioblastoma cells. It has been shown that small, non-coding RNAs, i.e., microRNAs (miRNAs), represent important regulators of gene expression at the epigenetic and post-transcriptional levels. The present thesis investigates the question whether certain miRNAs can contribute to the reduced MGMT expression in a subset of glioblastomas without *MGMT* promoter methylation. In the context of this work, two different glioblastoma cell lines were transiently transfected with five potentially MGMT-regulating miRNAs. MGMT expression was then examined at the transcript and protein levels in miRNA and control transfected glioblastoma cells. It turned out that the transfection of *hsa-miR-149-3p* significantly reduced MGMT expression in both glioblastoma cell lines compared to the transfection of control miRNA. A direct binding of *hsa-miR-149-3p* to the 3'-UTR of the *MGMT* transcript was detected using a luciferase assay. A sensitization of the glioblastoma cells to temozolomide treatment after overexpression of *hsa-miR-149-3p* could not be proven. However, there was a pro-apoptotic effect of overexpression of *hsa-miR-149-3p* in glioblastoma cells. In agreement with the literature data of other working groups, the own findings suggest that certain miRNAs, including *hsa-miR-149-3p*, can have an influence on MGMT expression in glioblastomas, but at the same time may also exert MGMT-independent effects on tumor growth.

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro
3'-UTR	3'-untranslatierte Region
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ago2	Argonaute2
ALA	5-Aminolävulinsäure
Amp^r	Ampicillin Resistenzgen
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
ARF1	Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor 1
ATRX	<i>Alpha-thalassemia/mental-retardation-syndrome-X-linked</i>
BCNU	Bis-Chlorethyl-NitrosoUrea
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C°	Grad Celsius
CDK4	<i>Cyclin dependent kinase 4</i>
CDKN2A/B	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CDS	<i>coding sequence</i>
CpG	Cytosin-Phosphatidyl-Guanin
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
D-PBS	<i>Dulbecco's Balanced Salt Solution</i>

ds-miRNA	<i>double-stranded micro ribonucleic acid</i>
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FOXM1	<i>Forkhead box M1</i>
g	Gramm
G-CIMP	<i>Glioma-CpG-island methylator phenotype</i>
GSK3α	Glykogensynthase-Kinase 3 α
Gy	Gray
h	Stunde
HiFCS	hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum
HOXB8	<i>Homeobox protein Hox-B8</i>
hsa	<i>Homo sapiens</i>
HSV-TK promoter	<i>Herpes simplex virus thymidine kinase promoter</i>
HU	<i>Universal Human Reference RNA</i>
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IgG	Immunglobulin G
k	Kilo
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
lncRNA	lange nicht-kodierende RNA
LOH	Verlust der Heterozygotie
m	Milli
M	Molar
MAFG-AS1	<i>MAF BZIP transcription factor G antisense RNA 1</i>

MAP-Kinase-Weg	<i>mitogen-activated protein-Kinase-Weg</i>
MDM2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
MES	2-(N-Morphino) Ethansulfonsäure
METTL1	Methyltransferase-like 1
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minute
miRNA	<i>micro ribonucleic acid</i>
MMR	<i>desoxyribonucleic acid mismatch repair</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MSP	Methylierungs-spezifische PCR
MTIC	5-(3-N-methyltriazen-1-yl) imidazol-4-carboxamid
mut	mutiert
n	Nano
NF1	Neurofibromatose Typ 1
NF-κB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
norm.	normalisiert
nt	Nukleotid
ori	<i>origin of replication</i>
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGFRA	<i>Platelet derived growth factor receptor alpha</i>
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
PIK3R1	<i>Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1</i>
PLK-1	<i>Polo-like kinase 1</i>
pre-miRNA	<i>precursor micro ribonucleic acid</i>
pre-miR-NC1	<i>Cy3TM Dye-Labeled Pre-miR Negative Control</i>

pri-miRNA	<i>primary micro ribonucleic acid</i>
P-S	Penicillin-Streptomycin
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
Ran-GTP	<i>Ras-related nuclear protein-GTP</i>
RB1	Retinoblastom 1
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkriptase
RT-qPCR	Reverse Transkriptase Echtzeit Polymeraskettenreaktion
s	Sekunde
SD	<i>standard deviation</i>
snRNA	<i>small nuclear ribonucleic acid</i>
Sp1	<i>Specificity protein 1</i>
SV40	Simian-Virus 40
T-ALL	T-Zell akute lymphatische Leukämie
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TMZ	Temozolomid
TRBP	<i>human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein</i>
U	<i>units</i>
v	<i>volume</i>
V	Volt
w	<i>weight</i>

WHO

World Health Organization

wt

Wildtyp

ZEB1-AS1

Zinc finger E-box-binding homeobox 1-Antisense RNA 1

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Genetische, epigenetische und chromosomale Veränderungen in Glioblastomen.	4
Abb. 2: MGMT hebt die TMZ Wirkung auf.	6
Abb. 3: Einflussfaktoren der MGMT Transkription und Expression.....	8
Abb. 4: Vereinfachte Darstellung der humanen miRNA Biogenese.....	10
Abb. 5: <i>MGMT</i> Expressionsanalyse in Glioblastomen mit bekanntem <i>MGMT</i> Promotormethylierungsstatus.	15
Abb. 6: Inverse Korrelation zwischen miRNA und <i>MGMT</i> mRNA Expression in <i>MGMT</i> Promotor-unmethylierten Glioblastomen.	16
Abb. 7: Schematische Darstellung der RT-Erststrang Synthese mit dem <i>miRCURY</i> <i>LNATM Universal RT microRNA PCR Kit</i>	29
Abb. 8: Schematische Darstellung des psiCHECK TM -2 Vektors von Promega.....	35
Abb. 9: Nukleotidsequenz der verwendeten DNA-Fragmente zur Klonierung in den psiCHECK TM -2 Vektor.....	36
Abb. 10: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Luciferase-Reportergen-Assays.....	38
Abb. 11: Überexpression der fünf potenziell <i>MGMT</i> -regulierenden miRNAs in den Zelllinien LN-18 und T98G nach Transfektion der entsprechenden pre-miRNAs.	42
Abb. 12: Verminderte <i>MGMT</i> mRNA Expression in <i>hsa-miR-149-3p</i> überexprimierenden LN-18 und T98G Glioblastomzelllinien.....	44
Abb. 13: Verminderte MGMT Proteinexpression nach <i>hsa-miR-149-3p</i> Überexpression in den Glioblastomzelllinien LN-18 und T98G.....	45
Abb. 14: <i>hsa-miR-149-3p</i> bindet direkt an die 3'-UTR vom <i>MGMT</i> Promotor in Glioblastomzelllinien.....	47
Abb. 15: Zellvitalität von Glioblastomzellen nach Transfektion mit <i>pre-miR-149-3p</i> und TMZ-Behandlung.	49
Abb. 16: Zellvitalität von Glioblastomzellen nach Transfektion von <i>pre-miR-149-3p</i> und TMZ-Behandlung mit Hilfe eines automatisierten Verfahrens.	50

Abb. 17: Caspase 3/7 Aktivität, Zellproliferation und Zellvitalität in Glioblastomzelllinien nach Überexpression von <i>hsa-miR-149-3p</i>	52
Abb. 18: Die onkogene und tumorsuppressive Wirkung der <i>hsa-miR-149-3p</i> ist abhängig von der Tumorentität.	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete miRNAs.....	18
Tabelle 2: Verwendete <i>Primer</i>	18
Tabelle 3: <i>LNATM PCR Primer Sets</i>	19
Tabelle 4: Verwendete Antikörper.	19
Tabelle 5: Verwendete Zellkulturmedien, Reagenzien, Enzyme und Kits.....	20
Tabelle 6: Verwendete Lösungen.	22
Tabelle 7: Verwendete Chemikalien.	23
Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	24
Tabelle 9: Verwendete Geräte.	26
Tabelle 10: Verwendete Computer-Software und Auswerteprogramme.	26
Tabelle 11: Übersicht aller Methoden, welchen eine Transfektion vorausging.	27
Tabelle 12: Einfacher Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese.....	30
Tabelle 13: Programm für die cDNA-Synthese.	30
Tabelle 14: Einfacher Reaktionsansatz für die semiquantitative RT-qPCR.....	31
Tabelle 15: Verwendetes PCR-Programm.	31
Tabelle 16: Einfacher Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese.....	31
Tabelle 17: Programm für die cDNA-Synthese.	32
Tabelle 18: Einfacher Reaktionsansatz für die semiquantitative RT-qPCR.....	32
Tabelle 19: Verwendetes PCR-Programm.	33
Tabelle 20: Beispielhafter Einfachansatz der Kotransfektion (miRNA).....	36
Tabelle 21: Übersichtstabelle aller bekannten miRNAs, die die MGMT Expression <i>in vitro</i> regulieren.....	55

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Glioblastome	1
1.1.1	Definition, Epidemiologie, Risikofaktoren	1
1.1.2	Klinik, Diagnostik	1
1.1.3	Therapie, Prognose	2
1.1.4	Molekulare Marker	3
1.2	MGMT	6
1.3	MiRNAs	8
1.3.1	Allgemeines	8
1.3.2	Biogenese und Effektormechanismen von miRNAs	9
1.3.3	Nomenklatur von miRNAs	11
1.3.4	MiRNAs in Glioblastomen	11
1.4	Vorarbeiten	14
1.5	Ziele dieser Arbeit	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Material	18
2.1.1	Humane Zelllinien	18
2.1.2	Vorläufer-miRNA Moleküle und Oligonukleotide	18
2.1.3	Antikörper	19
2.1.4	Bakterien	20
2.1.5	Zellkulturmedien, Reagenzien, Enzyme, Kits	20
2.1.6	Lösungen und Chemikalien	22
2.1.7	Verbrauchsmaterialien	24
2.1.8	Geräte	26
2.1.9	Computer-Software und Auswerteprogramme	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Zellkultur	27
2.2.2	Transfektion von Glioblastomzellen mit pre-miRNAs	27
2.2.3	RNA-Extraktion	28
2.2.4	Semiquantitative RT-qPCR zur Detektion von miRNAs	29
2.2.5	Semiquantitative RT-qPCR zur Detektion von proteinkodierenden Genen	31
2.2.6	Proteinextraktion	33

2.2.7	Proteinkonzentrationsbestimmung	33
2.2.8	<i>Western Blot</i> Analyse	33
2.2.9	Klonierung	34
2.2.10	Kotransfektion von synthetischen pre-miRNAs und Vektoren.....	36
2.2.11	Luciferase-Reportergen-Assay in transfizierten Glioblastomzelllinien ..	37
2.2.12	Zellproliferation-Assay in transfizierten Glioblastomzelllinien.....	38
2.2.13	Apoptose-Assay in transfizierten Glioblastomzelllinien.....	39
2.2.14	Zellvitalitätsmessung in transfizierten Glioblastomzelllinien mit und ohne TMZ-Behandlung	39
2.2.15	TMZ-Behandlung transfizierter Glioblastomzelllinien.....	39
2.2.16	Statistische Analyse.....	40
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Auswahl der miRNAs und der Glioblastomzelllinien	41
3.2	miRNA Überexpression nach Transfektion von T98G und LN-18 Gliomzelllinien mit synthetischen pre-miRNA Molekülen.....	42
3.3	Einfluss der Überexpression der fünf potenziell <i>MGMT</i> -regulierenden miRNAs auf die Expression der <i>MGMT</i> mRNA	43
3.4	Einfluss der Überexpression der fünf potenziell <i>MGMT</i> -regulierenden miRNAs auf die Expression des <i>MGMT</i> Proteins.....	44
3.5	Nachweis einer direkten Bindung der <i>hsa-miR-149-3p</i> in der 3'-UTR des <i>MGMT</i> Promotors	46
3.6	Untersuchung der TMZ-Sensitivität in <i>hsa-miR-149-3p</i> überexprimierenden Glioblastomzelllinien.....	48
3.7	Bestimmung der TMZ-Sensitivität in <i>pre-miR-149-3p</i> transfizierten Glioblastomzelllinien mit Hilfe TMZ-beschichteter Zellkulturplatten	49
3.8	Funktionale Effekte einer <i>hsa-miR-149-3p</i> Überexpression in humanen Glioblastomzelllinien.....	51
4	Diskussion	54
4.1	<i>MGMT</i> regulierende miRNAs in Glioblastomen	54
4.2	Fallstricke der transienten miRNA Überexpression	55
4.3	Die miRNA <i>hsa-miR-149-3p</i> bindet direkt an die 3'-UTR von <i>MGMT</i> und möglicherweise an eine ektope Stelle im psiCHECK™-2 Vektor.....	58
4.4	Die miRNA <i>hsa-miR-149-3p</i> hat keinen Einfluss auf die TMZ-Resistenz von Glioblastomzellen.....	59

4.5 <i>Hsa-miR-149-3p</i> fördert die Apoptoserate in Glioblastomzelllinien.....	62
4.6 Die miRNA <i>hsa-miR-149-3p</i> und ihre Rolle in Tumoren	64
4.7 Schlussfolgerungen.....	68
5 Literatur- und Quellenverzeichnis	69

1 Einleitung

1.1 Glioblastome

1.1.1 Definition, Epidemiologie, Risikofaktoren

Glioblastome sind primäre, astrozytär differenzierte Hirntumore, die nach der *World Health Organization* (WHO) Klassifikation 2016 als WHO-Grad IV-Tumoren eingestuft werden [1]. Mit einer Inzidenz von 3 bis 4 pro 100.000 Personen ist das Glioblastom der häufigste, maligne Hirntumor im Erwachsenenalter. Bei Erstdiagnose eines Glioblastoms sind die Patienten im Median 64 Jahre alt und Männer sind 1,57-fach häufiger betroffen als Frauen [2-4]. Als einzig gesicherter Risikofaktor für maligne Hirntumore gilt ionisierende Strahlung. Patienten sind dieser Strahlung beispielsweise im Rahmen einer Strahlentherapie, z.B. bei der Behandlung von Leukämien im Kindesalter, ausgesetzt [5, 6]. Selten treten Glioblastome bei Patienten mit Syndromen, wie beispielsweise dem Li-Fraumeni Syndrom, dem Turcot Syndrom oder der Neurofibromatose Typ 1, familiär gehäuft auf [7].

1.1.2 Klinik, Diagnostik

Typische Symptome bei Patienten mit einem Glioblastom kommen durch die intrakranielle Raumforderung inklusive einer schnellen Wachstumsdynamik des Tumors zustande. Es kommt hierbei zu epileptischen Anfällen, Kopfschmerzen, kognitiven Einschränkungen und fokal-neurologischen Defiziten, abhängig von der Tumorlokalisation [8-10]. Am häufigsten ist das Glioblastom im Großhirn lokalisiert, hierbei ist insbesondere der Frontal-, der Temporal- und der Parietallappen betroffen [2].

Nach der klinischen Untersuchung ist die diagnostische Methode der Wahl eine Magnetresonanztomographie (MRT) mit verschiedenen Wichtungen, mit und ohne Kontrastmittel. Glioblastome imponieren typischerweise durch eine ringförmige Kontrastmittelanreicherung und einem zentralen hypointensen Anteil, in dem Nekrosen lokalisiert sind [7, 11]. Die Diagnose wird anhand der histologischen Beurteilung gestellt: Glioblastome bestehen aus sehr heterogenem Tumorgewebe, in dem sich typischerweise hypoxische Nekrosezonen befinden, um die sich Tumorzellen pallisadenförmig anordnen. Zusätzlich kommen pathologische Gefäßproliferate vor [1, 7].

1.1.3 Therapie, Prognose

Zur Leitlinien-gerechten Therapie des Glioblastoms gehören drei Säulen: die chirurgische Resektion des Tumorgewebes, die Strahlentherapie und die Chemotherapie [12]. Eine möglichst vollständige Resektion des makro- und mikroskopisch sichtbaren Tumorgewebes stellt einen prognostisch günstigen Faktor für das Überleben des Patienten dar [13, 14]. Da Glioblastome allerdings ein infiltratives Wachstum aufweisen, ist eine vollständige Resektion der Tumormasse nicht möglich. Aus diesem Grund kommen verschiedene Hilfsmittel intraoperativ zum Einsatz, um einen möglichst großen Anteil des Tumorgewebes resezierern zu können, ohne relevante Einbußen neurologischer Funktionen in Kauf nehmen zu müssen. Als Hilfsmittel dienen intraoperativ das Operieren am wachen Patienten, elektrische Stimulationen der funktionellen Hirnareale, MRT- und Ultraschall-Bildgebungen sowie Tumorfärbungen mittels 5-Aminolävulinsäure (ALA) [15-18]. Postoperativ sollten Patienten mit einem Glioblastom nach dem Stupp-Protokoll behandelt werden. Dies beinhaltet eine kombinierte Radiochemotherapie mit Temozolomid (TMZ) [19].

Das zu bestrahlende Areal wird in der MRT Bildgebung festgelegt, hierbei schließt man das radiologisch erkennbare Tumorgewebe und einen Randsaum von ca. 2 bis 3 cm ein. Die Standarddosis beträgt 54 bis 60 Gy, welche fraktioniert in 1,8 bis 2 Gy Dosen über eine Gesamtdauer von sechs Wochen appliziert wird [19, 20].

Das Chemotherapeutikum der Wahl in der multimodalen Therapie des Glioblastoms ist TMZ, ein alkylierendes Chemotherapeutikum. TMZ ist ein Prodrug und wird spontan zum aktiven Metaboliten 5-(3-N-methyltriazin-1-yl)imidazol-4-carboxamid (MTIC) hydrolysiert. MTIC verursacht eine Methylierung an der N-7 Position von Guanin, an der O-3 Position von Adenin und an der O-6 Position von Guanin [21]. Die O-6 Methylierung von Guanin führt zu Fehlpaarungen in der DNA, sodass es wiederum zur Aktivierung von *DNA mismatch repair* (MMR) Enzymen kommt. Die MMR Enzyme versuchen diese Fehlpaarungen zu beseitigen, es kommt hierbei zu vermehrten DNA-Doppelstrangbrüchen mit nachfolgender Apoptose [22-24]. Die TMZ Gabe erfolgt parallel zur Strahlentherapie in einer täglichen oralen Dosis von 75 mg pro Quadratmeter Körperfläche. Nach den sechs Wochen von kombinierter Radiochemotherapie folgen zusätzliche sechs Zyklen von 28 Tagen, bei denen an jeweils fünf Tagen 150 bis 200 mg TMZ pro Quadratmeter Körperoberfläche verabreicht werden [19].

Patienten mit einem Glioblastom profitieren durch die Kombination einer Radio- und Chemotherapie mit einem längeren Überleben [19, 25, 26]. Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit einem neu aufgetretenem Glioblastom ist mit unter 5 % trotz multimodaler Therapie aber nach wie vor sehr niedrig [2, 3, 27]. Die meisten Patienten mit einem Glioblastom versterben am raumfordernden Prozess der Tumormasse, welcher zu einem erhöhten intrakraniellen Druck und letztlich zum zentralen Regulationsversagen führt [10].

1.1.4 Molekulare Marker

Seit Aktualisierung der WHO Klassifikation im Jahr 2016 erfolgte eine Einteilung der Tumoren des zentralen Nervensystems nach histologischen und molekularen Markern. Dies ermöglicht nun die Unterscheidung von histopathologisch gleichen Tumoren in spezifischere molekulare Untergruppen, sodass sowohl eine gezieltere Diagnostik, als auch eine gezieltere Therapie gewährleistet werden kann [7, 28].

Ein sehr wichtiger diagnostischer und prognostischer molekularer Marker ist die Isocitrat-Dehydrogenase (IDH). In ca. 90 % der Glioblastome liegt keine Mutation im *IDH1* oder *IDH2* Gen vor. Diese Tumoren werden als Glioblastom, IDH-Wildtyp (wt) bezeichnet [7, 29, 30]. Bei Tumoren, die als IDH-mutiert (mut) bezeichnet werden, liegt eine Punktmutation im *IDH1* oder *IDH2* Gen vor, wobei *IDH2* viel seltener betroffen ist [31-33]. Verglichen mit den IDH-wt Glioblastompatienten sind Patienten mit einem IDH-mut Glioblastom in einem früheren Lebensalter betroffen und zeigen ein längeres Überleben. Weiterhin entwickeln sich IDH-mutierte Glioblastome häufiger durch maligne Progression aus niedriggradigen Vorläufertumoren, d.h. IDH-mutierten Astrozytomen der WHO-Grade II oder III [29, 31-33].

Prinzipiell gibt es drei Signalwege, die in Glioblastomen, IDH-wt sehr häufig genetische Aberrationen vorweisen und vermutlich für die Pathogenese mitverantwortlich sind. Genetische Variationen im *PI3K/AKT/mTOR* Signalweg liegen bei ca. 88% der Glioblastomen vor. Eine Beeinträchtigung dieses molekularen Signalwegs wirkt sich auf die Zellproliferation und das Zellüberleben aus [34-36]. Häufige in Glioblastomen entdeckte Mutationen in diesem Signalweg sind Mutationen im *Phosphatase and tensin homolog (PTEN)* Gen und *Epidermal growth factor receptor (EGFR)* Amplifikationen, aber auch *Platelet derived growth factor receptor alpha (PDGFRA)* Amplifikationen [32, 35, 37]. Ähnlich häufig sind genetische Veränderungen im p53-Signalweg in Glioblastomen vorzufinden, die einen Einfluss auf die Regulation von Apoptose und Zellseneszenz haben.

Zu den genetischen Veränderungen in diesem Signalweg gehören zum Beispiel *Mouse double minute 2 homolog (MDM2)* Genamplifikationen oder *TP53* Mutationen. In der Summe ist dieser Signalweg in Glioblastomen in 87 % der Fälle betroffen [32, 34, 36]. Der Retinoblastom-Signalweg (RB) zeigt sich in Glioblastomen in 78 % der Fälle verändert. Hierdurch wird die Regulation des Zellzyklus am G1-/S-Phase-Checkpoint gestört und die Tumorzellen können nicht mehr in einen Zellzyklusarrest gehen [34, 36]. Am häufigsten sind Deletionen auf dem Chromosomenarm 9p, die zu einem Verlust der Gene *Cyclin dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)* und *CDKN2B* führen, welche die Tumorsuppressorproteine p16^{INK4a}, p15^{ink4b} und p14^{ARF} kodieren, die am RB- und am p53-Signalweg beteiligt sind [38]. In Abb. 1 sind in Glioblastomen häufig vorkommende genetische, epigenetische und chromosomale Veränderungen aufgeführt.

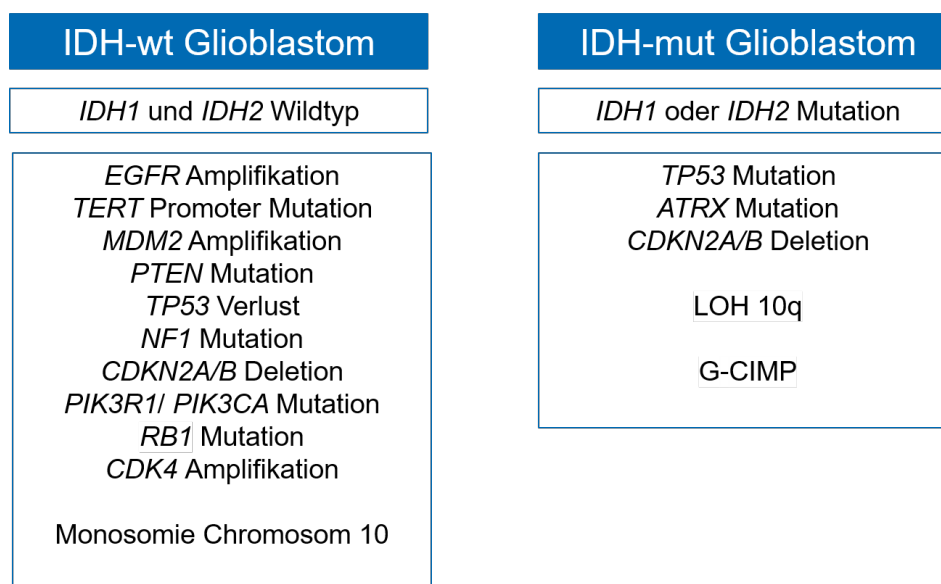


Abb. 1: Genetische, epigenetische und chromosomale Veränderungen in Glioblastomen.

Hier gelistet sind die am häufigsten vorkommenden genetischen, epigenetischen und chromosomalen Veränderungen in Glioblastomen unterteilt nach dem primären Unterscheidungsmerkmal, ob eine Mutation der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) vorliegt (IDH-mut) oder nicht (IDH-wt). IDH-mut Glioblastome entstehen öfter aus niedriggradigen Vorstufen als sogenannte sekundäre Glioblastome. In IDH-wt Glioblastome kommen häufig genetische Veränderungen des *Epidermal growth factor receptor (EGFR)* Gens und des *Telomerase reverse transcriptase (TERT)* Gens vor, während *TP53* Mutationen häufiger in IDH-mut Glioblastomen sind. Eine detaillierte Erklärung der einzelnen Einflussfaktoren lassen sich dem Fließtext entnehmen. (MDM2: *Mouse double minute 2 homolog*, PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*, NF1: *Neurofibromatose Typ 1*, CDKN2A/B: *Cyclin dependent kinase inhibitor 2*, PIK3R1: *Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1*, PIK3CA: *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*, RB1: *Retinoblastom 1*, CDK4: *Cyclin dependent kinase 4*, ATRX: *Alpha-thalassemia/mental-retardation-syndrome-X-linked*, PDGFRA: *Platelet derived growth factor receptor alpha*, LOH: Verlust der Heterozygotie; G-CIMP: *Glioma-CpG-island methylator phenotype*) [36, 39-41]

Die molekularen Alterationen unterschieden sich dementsprechend, ob ein IDH-wt oder IDH-mut Glioblastom vorliegt. Deletionen des Chromosoms 10 sind bei beiden Glioblastomentitäten etwa gleich häufig vorhanden. Bei IDH-wt Glioblastomen liegt häufig eine Monosomie des Chromosoms 10 vor, hingegen kommt es bei IDH-mut Glioblastomen häufiger zu einem Verlust des langen Arms von Chromosom 10 [29, 35, 39, 40]. Auf dem Chromosom 10 liegt unter anderem der Genlocus des Tumorsuppressorgens *PTEN*. Mutationen im *TP53* Gen und im *Alpha-thalassemia/mental-retardation-syndrome-X-linked (ATRX)* Gen kommen in IDH-mut Glioblastomen häufiger vor als in IDH-wt Glioblastomen [36, 39-41]. Das Vorliegen einer IDH-Mutation führt häufig zu einer global erhöhten DNA-Methylierung, was als *Glioma-CpG-island methylator phenotype (G-CIMP)* bezeichnet wird [36].

Bei IDH-wt Glioblastomen kommen häufiger Amplifikationen des *EGFR* Gens, Deletionen des *CDKN2A/B* Genlokus, Mutationen des *PTEN* Gens und Mutationen des Promotors des *Telomerase reverse transcriptase (TERT)* Gens vor. Auch das *MDM2* Gen ist häufiger in IDH-wt als in IDH-mut Glioblastomen verändert, insbesondere im Rahmen einer *MDM2* Amplifikation [29, 32, 35, 36, 40, 41]. Für manche molekularen Veränderungen abseits vom IDH-Status wurde eine mögliche prognostische Bedeutung berichtet [35]. Bislang ist allerdings nur der Nachweis einer homozygoten Deletion des *CDKN2A/B* Genlokus in IDH-mut Glioblastomen von diagnostischer und prognostischer Bedeutung [42].

1.2 MGMT

Durch eine Chemotherapie mit dem alkylierenden Therapeutikum TMZ wird – unter anderem – eine Methylgruppe auf die O⁶-Position von Guanin übertragen und es entsteht O⁶-Methylguanin (Abb. 2). Das DNA-Reparaturenzym O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) entfernt die Methylgruppe von O⁶-Methylguanin und überträgt sie auf einen Cysteinrest (Cys145). Bei dieser Reaktion wird MGMT irreversibel verbraucht („Suizidreaktion“) [43]. Die Menge an MGMT ist dementsprechend entscheidend für dessen Wirkungsausmaß [24]. In Glioblastomzellen liegt MGMT sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma vor [44].

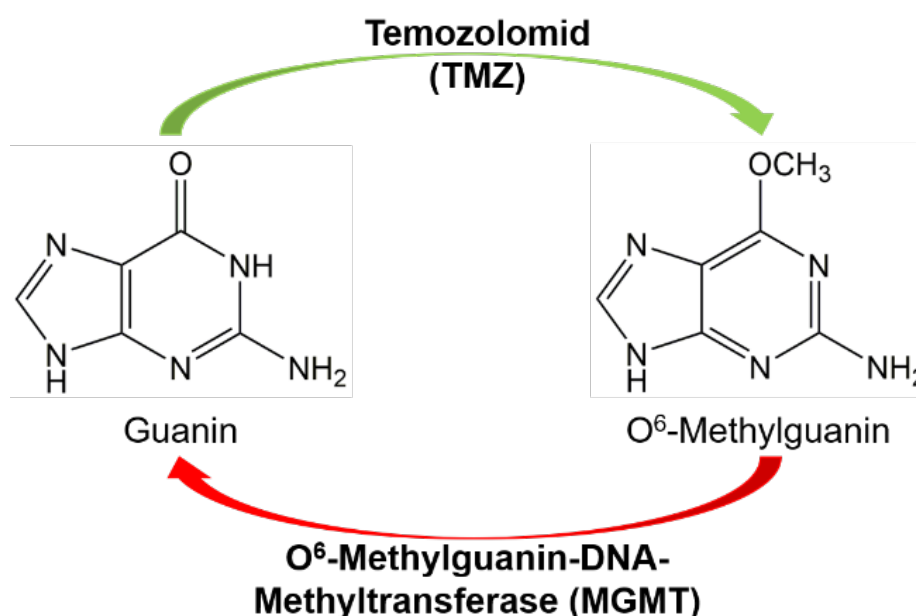


Abb. 2: MGMT hebt die TMZ Wirkung auf.

Das alkylierende Chemotherapeutikum Temozolomid (TMZ) fügt eine Methylgruppe an der Base Guanin hinzu. O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) ist ein DNA-Reparaturprotein, welches genau diese Alkylierung entfernt. Somit ist MGMT der Gegenspieler von TMZ.

Die Expression der *MGMT messenger ribonucleic acid* (mRNA) und des MGMT Proteins wird epigenetisch durch die Methylierung der Cytosin-Phosphatidyl-Guanin (CpG) Insel im 5'-gelegenen *MGMT* Promotorbereich beeinflusst. Hierbei bewirkt ein hypermethylierter Promotor eine verminderte *MGMT* Transkription und damit *MGMT* Expression [45-48]. Eine CpG Insel bezeichnet einen Genabschnitt von einer Länge von meist mehreren hundert Basenpaaren, der eine überdurchschnittlich hohen Anteil von Cytosin- und Guanin-Abfolgen enthält [49]. Eine CpG Insel im *MGMT* Promotor ermöglicht die genannte

epigenetische Regulierung via DNA-Methylierung [50]. Gängige Methoden zur Bestimmung der *MGMT*-Promotormethylierung sind hierbei zum Beispiel eine Methylierungs-spezifische PCR (MSP) [48, 51, 52] oder eine Pyrosequenzierung [53].

Patienten mit einem methylierten *MGMT* Promotor im Tumorgewebe überleben länger und sprechen besser auf die multimodale Therapie mit einer Resektion, Bestrahlung und TMZ Behandlung an, als Glioblastompatienten mit einem unmethylierten *MGMT* Promotor. Die *MGMT*-Promotormethylierung ist somit ein prognostischer und prädiktiver Biomarker, der sich in der Routinediagnostik etabliert hat [13, 26, 54-57]. Bei ca. der Hälfte der Glioblastompatienten liegt ein hypermethylierter *MGMT* Promotor vor [54, 56, 58].

Neben der *MGMT*-Promotormethylierung gibt es noch weitere Faktoren, die die *MGMT* Expression beeinflussen können. Ein grober Überblick über weitere Einflussfaktoren der *MGMT* Expression auf Gen-, mRNA- und Protein-Ebene können der Abb. 3 entnommen werden [59].

Die Transkriptionsfaktoren *Specificity protein 1* (Sp1), *Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-κB), *Activator protein* (AP-1) erhöhen jeweils die *MGMT* Transkription durch Bindung an den *MGMT* Promotor [60-63]. Die Acetylierung von Histon 3 und Histon 4 führt zum Auseinanderziehen des Chromatins, sodass der *MGMT* Promotor für Transkriptionsfaktoren zugänglich ist und über diesen Weg ebenfalls die Transkription von *MGMT* gesteigert werden kann [46, 64]. Das p53 Protein inhibiert über die Hemmung des Transkriptionsfaktor Sp1 die Transkription des *MGMT* Gens [61]. Eine Histon 3 Lys9 Methylierung führt zur Minderung der *MGMT* Transkription [46, 65]. Die *MGMT*-Promotormethylierung ist aktuell der wichtigste prädiktive Marker in der Therapie von Glioblastomen [54]. Abseits der *MGMT*-Promotormethylierung zeigte sich, dass eine erniedrigte *MGMT* Expression auf Proteinebene ebenfalls einen prognostisch günstigen Faktor für das Überleben von Glioblastompatienten darstellt [66, 67]. Zusätzlich haben sich *micro ribonucleic acid* (miRNA) als entscheidende Regulatoren der *MGMT* Expression gezeigt. Was miRNAs sind und welche Rolle sie in Glioblastomen spielen, ist Gegenstand der folgenden Kapitel.

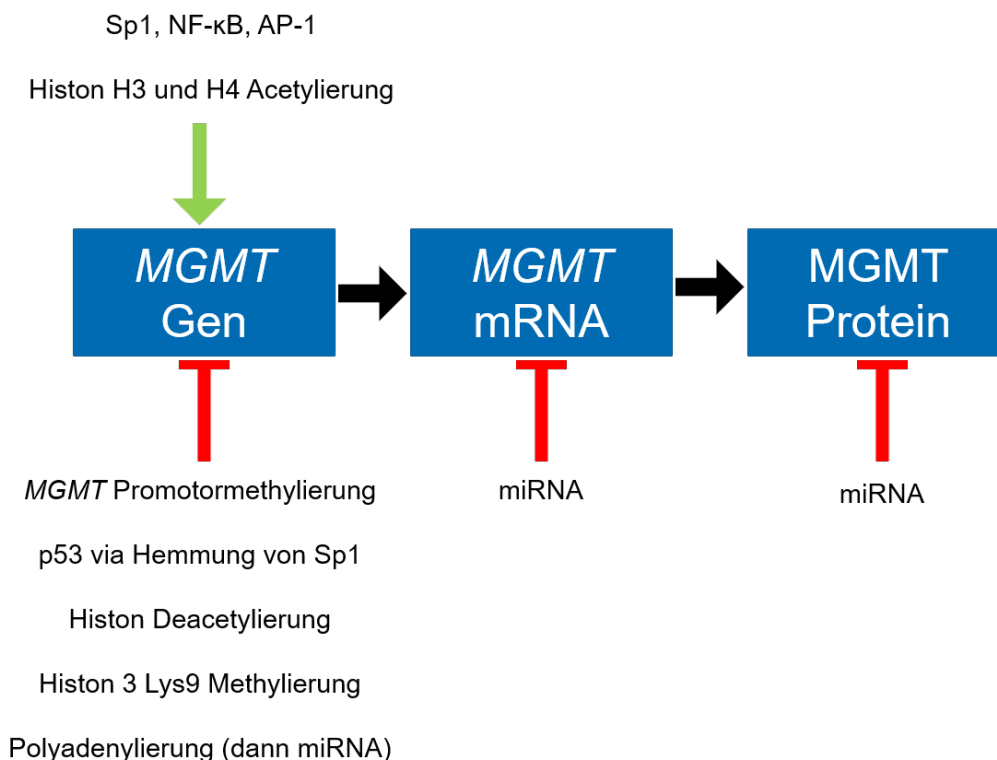


Abb. 3: Einflussfaktoren der MGMT Transkription und Expression.

Die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) Expression kann auf Gen-, auf *messenger ribonucleic acid* (mRNA) und auf Proteinebene beeinflusst werden. Eine detaillierte Erklärung der einzelnen Einflussfaktoren lassen sich dem Fließtext entnehmen. (Sp1: *Specificity protein 1*, NF-κB: *Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*; AP-1: *Activator protein 1*); Abbildung modifiziert nach Cabrini *et al.* 2015 [59]

1.3 MiRNAs

1.3.1 Allgemeines

MiRNAs sind ca. 22 Nukleotide (nt) lange, einzelsträngige RNA Transkripte, welche nicht Protein-kodierend sind [68]. Im Jahr 1993 wurde die erste miRNA von Lee *et al.* Beschrieben [69]. Die Autoren entdeckten, dass das Gen von *lin-4* im Nematoden *Caenorhabditis elegans* kein Protein, sondern eine 22 nt und eine 60 nt lange Gensequenz kodierte. Diese Gensequenzen waren partiell komplementär zur 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) von *lin-14* [69]. Mit der Entdeckung der miRNA *let-7*, einer evolutionär hochkonservierten miRNA, im Jahr 2000 durch Reinhart *et al.* konnte ein wichtiger Wirkmechanismus der miRNAs beschrieben werden: MiRNAs können kodierende Gene regulieren und spielen eine entscheidende Rolle im Organismus [70]. Mittlerweile sind in

der aktuellen Version (v22.1) der miRNA Datenbank *miRBase* 38589 Einträge (Stand: Oktober 2018) an bisher beschriebenen miRNAs hinterlegt.

1.3.2 Biogenese und Effektormechanismen von miRNAs

Die miRNA-kodierende Gene können intergenisch, exonisch oder intronisch lokalisiert sein. Die Biogenese der miRNA beginnt im Zellkern mit der Transkription poly- oder monocistronischer Gene, wodurch ein langes Primärtranskript, die *primary micro ribonucleic acid* (pri-miRNA), entsteht. Dieses pri-miRNA Transkript bildet eine charakteristische Haarnadelschleifenstruktur aus (siehe Abb. 4). Bei polycistronischen Genen entstehen aus einer pri-miRNA mehrere miRNAs. Dieser Zusammenschluss an miRNAs wird als Cluster bezeichnet [71-74]. Die Transkription erfolgt hauptsächlich durch die RNA Polymerase II. Hierbei kommt es ko- bzw. posttranskriptionell zur Polyadenylierung am 3'-Ende und zum *Capping* am 5'-Ende der pri-miRNA. Manchmal wird die Transkription durch die RNA Polymerase III katalysiert [75, 76]. Drosha, eine humane RNase III Endonuklease, bildet mit dem Protein DGCR8 den *Microprocessor complex*. Dieser spaltet die pri-miRNA im Zellkern, sodass *precursor micro ribonucleic acid* (pre-miRNA) mit einer Länge von etwa 70 nt resultieren [77]. Die pre-miRNA wird durch das Protein Exportin-5 im Beisein des Kofaktors *Ras-related nuclear protein GTP* (Ran-GTP) aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert [78]. Das Protein Dicer, eine weitere RNase III Endonuklease, die im Zytoplasma lokalisiert ist, spaltet die doppelsträngige pre-miRNA, sodass die Schleife entfernt wird und ein zwei Nukleotid-langer Überhang am 3'-Ende übrigbleibt. Die reife miRNA wird durch Dicer abschließend in zwei einzelsträngige miRNA Moleküle gespalten [75, 79-81], einen Hauptstrang (*guide strand*) und einen komplementäreren Strang (*passenger strand*) [80].

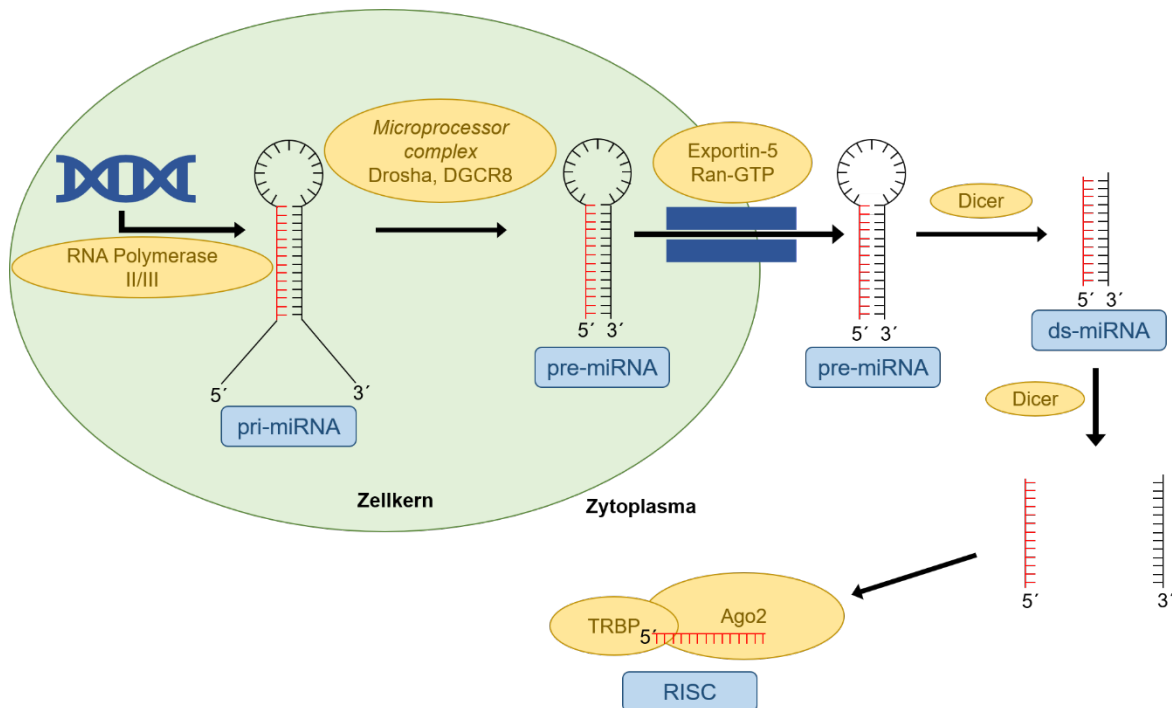


Abb. 4: Vereinfachte Darstellung der humanen miRNA Biogenese.

Die Biogenese der *micro ribonucleic acid* (miRNA) beginnt durch die RNA Polymerase II oder III vermittelte Transkription von miRNA Genen, welche exonisch, intronisch oder intergenisch lokalisiert sein können. Es entsteht ein Primärtranskript, die *primary* miRNA (pri-miRNA). Die pri-miRNA wird von dem *Microprocessor complex*, welcher unter anderem aus Drosha und DGCR8 besteht, zur 70 Nukleotid langen *precursor micro ribonucleic acid* (pre-miRNA) geschnitten. Die pre-miRNA wird durch Exportin-5 und Ran-GTP aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert. Im Zytoplasma entfernt Dicer die pre-miRNA Schleife und teilt die doppelsträngige miRNA (ds-miRNA) in zwei Einzelstränge auf. Die reife miRNA setzt sich mit den Proteinen *human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein* (TRBP) und Argonaute2 (Ago2) zum *RNA-induced silencing complex* (RISC) Komplex zusammen. Der RISC Komplex kann posttranskriptional mRNAs in ihrer Expression regulieren.

Ein alternativer Weg, über den miRNAs entstehen können, geht über die Transkription von intronischen Sequenzen, die beim Splicing der DNA entstanden sind. Hierbei ist ein entscheidender Unterschied in der Biogenese, dass diese Biogenese der miRNA nicht über die Prozessierung der pre-miRNA durch das Protein Drosha abläuft, die weiteren Schritte verlaufen jedoch gleich. Die miRNAs, die aus Introns entstanden sind werden *mirtrons* genannt und haben ebenfalls Gen-regulierende Funktionen [82, 83]. Intronische miRNAs werden in der Regel mit deren Wirtsgen koexprimiert [71].

Aus der doppelsträngigen miRNA resultieren der *guide strand* und der *passenger strand*. Meistens zerfällt der *passenger strand* rasch, der *guide strand* der miRNA setzt sich zum *RNA-induced silencing complex* (RISC) Komplex mit dem *human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein* (TRBP) und mit Argonaute2 (Ago2), einem Protein der Argonautenfamilie als katalytisches Zentrum, zusammen. Der RISC Komplex

kann ATP-unabhängig Gene ausschalten. Diesen Vorgang nannte man RNA-Interferenz (RNAi), siehe hierzu Abb. 4 [84, 85]. Ein Mechanismus der RNAi ist die Degradation einer mRNA mittels des folgend beschriebenen Mechanismus: eine miRNA besitzt eine sogenannte *seed region*, dies bezeichnet die 2. bis 8. Base vom 5'-Ende ausgezählt. Mittels Watson-Crick-Paarung kann bei Komplementarität der *seed region* zur 3'-UTR der Ziel mRNA die Ziel mRNA durch den RISC Komplex mittels Deadenylierung und *decapping* degradiert werden [86, 87]. Zusätzlich kann eine miRNA die Translation der Ziel mRNA hemmen, mit dem Resultat, dass keine Proteine entstehen. Somit können durch miRNAs Gene auf Transkript und auf Protein Ebene reguliert werden [84, 88-90].

1.3.3 Nomenklatur von miRNAs

Klassischerweise werden miRNAs annotiert, in dem die ersten drei Buchstaben im Namen der miRNA den Organismus darstellen, in dem sie vorliegen, beispielsweise *hsa* für *Homo sapiens*. Folgend kommt das Präfix miR- mit der Nummer der miRNA, zum Beispiel *hsa-miR-324*. Anschließend muss noch unterschieden werden, ob es sich um den dominanten Strang, den *guide strand* oder um den passiven Strang handelt, den *passenger strand*. Wenn es eindeutig ist, welcher Strang dominant ist, bekommt die *guide strand* miRNA keine gesonderte Annotation und der *passenger strand* wird mit einem Stern versehen und heißt dann zum Beispiel *hsa-miR-324**. Wenn kein eindeutiger *guide strand* festgelegt werden kann, erfolgt die Namensgebung basierend auf das jeweilige mitgenommene Ende der pre-miRNA. Hierbei bekommt die miRNA mit dem 3'-Ende am Ende ein -3p angehängt, beim 5'-Ende ist es dann -5p (siehe Abb. 4). Eng verwandte reife miRNAs bekommen am Ende einen Buchstaben als Suffix, zum Beispiel *hsa-miR-34a* und *hsa-miR-34b* [68].

1.3.4 MiRNAs in Glioblastomen

Mit der Feststellung, dass miRNAs die Genexpression epigenetisch regulieren können, begann die Forschung nach möglichen Einflüssen von miRNAs auf die Karzinogenese. Mittels bioinformatischer Forschung konnte festgestellt werden, dass ca. ein Drittel aller humanen Gene durch miRNAs reguliert werden [91]. Zusätzlich begann im Jahr 2005 das Projekt *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), im Rahmen dessen komplette Exome von sehr vielen Glioblastompatienten sequenziert und bioinformatisch analysiert wurde, sodass eine frei zugängliche Datenbank mit molekularen Profilen einzelner Glioblastome entstand [34]. Im Rahmen dessen konnte mittels beispielsweise Korrelationsanalysen und funktionellen

Assays in verschiedenen Arbeiten dargestellt werden, dass miRNAs in Glioblastomen vielseitige Rollen haben.

Hierzu gehört die Tumorgenese vom Glioblastom. *Hsa-miR-21* beispielsweise ist eine miRNA, welche in Glioblastomen verglichen mit gesundem Hirnparenchym überexprimiert ist [57, 92, 93]. Der miRNA konnte eine Apoptose-hemmende Wirkung in Glioblastomzelllinien nachgewiesen werden, sodass das onkogene Potential der *hsa-miR-21* mit zur Glioblastomentstehung beitragen könnte [92]. Auch *hsa-miR-93* trägt zur Pathogenese von Glioblastomen bei, zum Beispiel durch Förderung des Tumorwachstums, der Angiogenese und des Zellüberlebens durch direkte Regulation von Integrin-b8 [94].

Im Gegensatz dazu sind Mitglieder der *hsa-miR-181* Familie als herunterreguliert in Gliomen verschiedener WHO-Grade verglichen mit nicht-neoplastischem Hirngewebe nachgewiesen worden. Eine tumorsuppressive Funktionsweise durch Hemmung der Zellproliferation, -invasion und der Apoptose-Induktion wurde experimentell nachgewiesen [95, 96]. Weitere tumorsuppressive miRNAs sind *hsa-miR-328* und *hsa-miR-184*, da sie die Zellvitalität von Glioblastomen reduzieren und die Zellproliferation hemmen [97, 98].

Häufig wurden miRNA-Expressionsmuster in Glioblastomen untersucht, um prognostische Marker zu finden. Beispielsweise konnte basierend auf dem TCGA Datensatz festgestellt werden, dass die Expression der miRNAs *hsa-miR-21* und *hsa-miR-210* in Glioblastomgewebe mit der Aggressivität vom Glioblastom korrelieren, sodass eine schlechtere Prognose und ein schnelleres Krankheitsfortschreiten bei höherem Expressionslevel der miRNAs resultiert [57, 99]. Auch *hsa-miR-181c* und *hsa-miR-451* sind mit einer schlechten Prognose assoziiert [57, 100]. Bei anderen miRNAs konnte wiederum ein protektiver Zusammenhang festgestellt werden: eine erhöhte *hsa-miR-195*, *hsa-miR-196b*, *hsa-miR-150-5p* und *hsa-miR-328-3p* Expression in Glioblastomen sind mit einem längerem Überleben, während eine niedrige *hsa-miR-328* Expression mit einem kürzerem Überleben der Patienten assoziiert wurde [57, 97, 101]. Ebenfalls die Kombination von mehreren miRNAs erlaubte eine Prognoseeinordnung von Glioblastompatienten abgesehen von bisher etablierten prognostischen Glioblastom-Markern [102-107]. Eine Prognoseabschätzung mittels einer miRNA-Signatur gelang auch binnen der Subgruppe von Glioblastompatienten mit einem methylierten *MGMT* Promotor [108].

Auch zu Früherkennung von einem Glioblastom zeigten verschiedene Arbeiten bereits möglich Ansätze der miRNA-Forschung, beispielweise durch Detektion des

miRNA-Expressionsmuster im Patientenblut. Das Plasma-Expressionslevel von *hsa-miR-21*, *hsa-miR-128* und *hsa-miR-324-3p* erlaubte eine Unterscheidung von Patienten mit und ohne ein Gliom mit hoher Sensitivität und Spezifität. Zusätzlich unterschied sich die miRNA-Expression zwischen Tumoren unterschiedlicher WHO-Grade [109]. Die Kombination sieben verschiedener miRNAs nutzen Yang *et al.* in Blutuntersuchungen, um ebenfalls einen Patienten mit einem Astrozytom von einem Patienten ohne eine cerebrale Neoplasie abzugrenzen [110]. Die unterschiedlichen miRNA-Expressionsmuster eröffnen Möglichkeiten zur präziseren molekularen Eingrenzung von Glioblastomen und damit zu einer gezielteren Diagnostik und gezielteren Therapien. Beispielsweise konnte durch Wu *et al.* experimentell nachgewiesen werden, dass das Expressionslevel von *hsa-miR-328* in Glioblastomen niedriger ist als in Gliomen eines niedrigeren WHO-Grades [97]. Auch das Expressionsniveau von *hsa-miR-184* konnte mit dem WHO-Grad des Glioms korreliert werden, hierbei lag eine niedrigere *hsa-miR-184* Expression vor, desto höher der WHO-Grad war [98]. Die *hsa-miR-21* zeigte sich wiederum in Glioblastomen höher exprimiert als in Gliomen niedrigeren WHO-Grades [111]. Die Wege, über die miRNAs in Glioblastomen all diese unterschiedlichen Effekte erreichen sind vielseitig. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die epigenetische Regulierung von Genen durch miRNAs. Zum Beispiel ist die *hsa-miR-26a* in der Lage, PTEN durch Bindung an die 3'-UTR der *PTEN* mRNA zu regulieren [112]. Die *hsa-miR-101* ist eine miRNA, welche die Methyltransferase EZH2 reguliert. EZH2 ist ein onkogenes Protein und ist in Glioblastomen verglichen mit nicht-neoplastischen Gehirngewebe erhöht exprimiert [113, 114].

Die Kenntnisse über die Rolle all dieser verschiedenen miRNAs in der Pathogenese von Glioblastomen beherbergt auch ein Potenzial zur Therapieoptimierung. Die miRNA *hsa-miR-21* stellte sich beispielsweise als eine miRNA heraus, welche die Apoptoserate in Gliomzellen reduziert und zu einer TMZ-Sensitivitätsminderung und Therapieresistenz führt [115]. Hingegen führt die *hsa-miR-204* über eine Hemmung vom Protein FAP- α zur TMZ Sensitivierung [116]. Auch *hsa-miR-195* führt zu einer TMZ-Sensitivierung in Glioblastomzellen, in diesem Fall durch Regulation von CCNE1 [117]. Insgesamt ermöglichen diese Erkenntnisse über die Rolle von miRNAs, dass man miRNAs bewusst zur Therapiebeeinflussung von Gliomen nutzen könnte. Heutzutage gibt es nach aktuellem Wissensstand allerdings noch keine etablierte Therapie, die miRNAs in die Glioblastombehandlung einbezieht.

Zusammenfassend ließ sich also feststellen, dass miRNAs eine Rolle in der Pathogenese, Diagnostik, Therapiesensitivität und Prognose von Glioblastomen spielen oder spielen könnten. Da heutzutage durch die Arbeit von Hegi *et al.* die *MGMT*-Promotormethylierung einer der wichtigsten prognostischen und prädiktiven Marker für Glioblastome wurde, lag ein besonderer und vielversprechender Fokus in den letzten Jahren darauf, miRNAs zu finden, die die *MGMT*-Promotormethylierung und/oder die *MGMT* Expression beeinflussen [54].

1.4 Vorarbeiten

Frau Dr. Christina Rautenberg konnte in Vorarbeiten am Institut für Neuropathologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reifenberger zeigen, dass die *MGMT* mRNA Expression auch in einer Subgruppe von Glioblastomen mit unmethyliertem *MGMT* Promotor erniedrigt ist (Abb. 5). Frau Dr. Rautenberg hat mittels semiquantitativer reverser Transkriptase Echtzeit-PCRs (RT-qPCR) das *MGMT* mRNA Expressionsniveau in *MGMT* Promotor-methylierten und -unmethylierten Glioblastomen bestimmt. Hierbei zeigten ungefähr 50 % der Tumore mit unmethyliertem *MGMT* Promotor eine niedrigere *MGMT* mRNA Expression als die höchste, in Promotor-methylierten Tumoren nachgewiesene *MGMT* Expression (Abb. 5). Die von Frau Dr. Rautenberg durchgeführten Untersuchungen an humanen Tumorgewebeproben erfolgten mit Genehmigung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät (Studennummer: 3876).

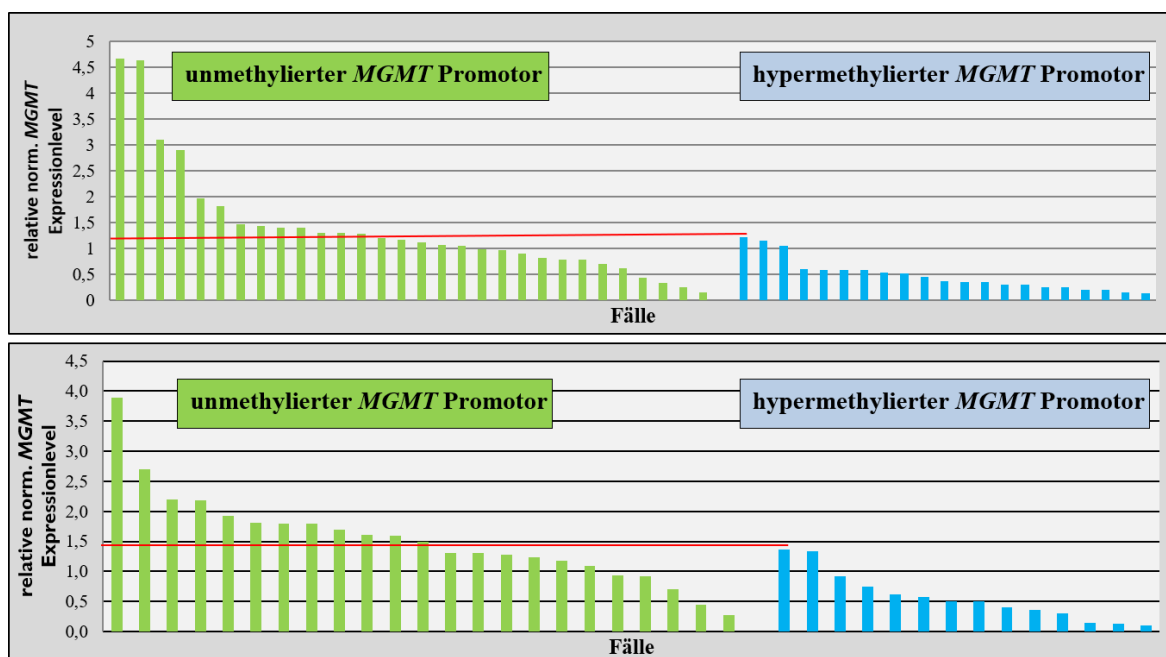


Abb. 5: MGMT Expressionsanalyse in Glioblastomen mit bekanntem MGMT Promotormethylierungsstatus.

Relatives, normalisiertes (norm.) O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase messenger ribonucleic acid (MGMT mRNA) Expressionslevel in Glioblastomen mit unmethyliertem (grüne Balken) und methyliertem (blaue Balken) MGMT Promotor. Die Expression wurde mittels semiquantitativer reverser Transkriptase Echtzeit-PCRs bestimmt. *Universal Human Reference RNA* diente als Kalibrator und *ARF1* als Referenzen. Die rote horizontale Linie markiert das Expressionsniveau der höchsten MGMT mRNA Expression in Glioblastomen mit hypermethyliertem MGMT Promotor. Ungefähr 50 % der primären Glioblastome mit einem unmethylierten MGMT Promotor haben eine MGMT mRNA Expression, die so niedrig ist, wie in den Tumoren mit hypermethyliertem MGMT Promotor. Unveröffentlichte Daten von Dr. Christina Rautenberg, 2014.

Basierend auf dieser Feststellung wurde deutlich, dass abgesehen vom MGMT-Promotormethylierungsstatus sich weitere Faktoren auf die MGMT mRNA Expression auswirken können, wie z.B. miRNAs. Basierend auf einer Datenbankanalyse mittels *miRWalk* wurden 118 miRNAs identifiziert, die potenziell an komplementäre Sequenzen in der 3'-UTR von MGMT binden können [118, 119]. Es wurden solche miRNAs ausgeschlossen, die schon als „MGMT mRNA regulierend“ publiziert wurden (*hsa-miR-181d*, *hsa-miR-767-3p*, *hsa-miR-648*, *hsa-miR-603* [120, 121]). Der TCGA Datensatz wurde benutzt, um eine inverse Korrelation der Expression der bisher ausgewählten miRNAs und MGMT zu untersuchen. Nachdem miRNAs, die nur ein geringes Expressionsniveau in Glioblastomen haben, ausgeschlossen wurden, blieben drei miRNAs *hsa-miR-149-3p*, *hsa-miR-345-5p* und *hsa-miR-491-5p* übrig, die die Kriterien (1) Bindungsstelle in der 3'-UTR von MGMT vorhergesagt, (2) hohes Expressionsniveau in Glioblastomen und (3) eine inverse Korrelation zur MGMT mRNA Expression in Glioblastomen aufwiesen (Abb. 6).

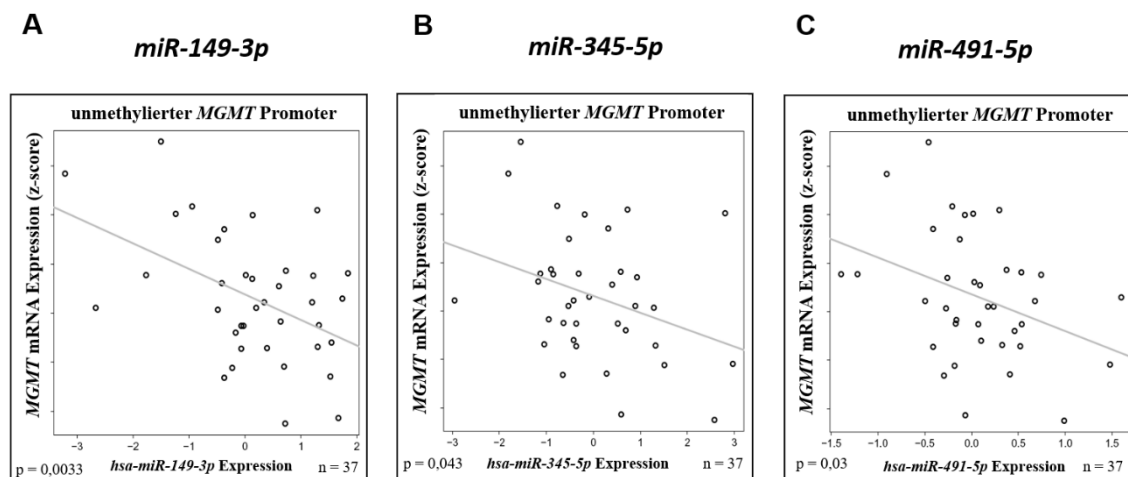


Abb. 6: Inverse Korrelation zwischen miRNA und *MGMT* mRNA Expression in *MGMT* Promotor-unmethylierten Glioblastomen.

Dargestellt ist eine Korrelationsanalyse der *hsa-miR-149-3p* (A), der *hsa-miR-345-5p* (B) und der *hsa-miR-491-5p* (C) Expression und der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase messenger ribonucleic acid (*MGMT* mRNA) Expression in *MGMT* Promotor-unmethylierten Glioblastomen aus dem TCGA Datensatz. Mittels Pearson-Korrelation konnte bei allen drei gezeigten *micro ribonucleic acid* (miRNAs) eine signifikante inverse Korrelation zur *MGMT* mRNA Expression festgestellt werden. Unveröffentlichte Daten von Dr. Christina Rautenberg, 2014.

Hinzugefügt wurden die miRNAs *hsa-miR-324-3p* und *hsa-miR-93-3p*, welche sich im Rahmen der Datenbankanalyse in Rezidiv-Glioblastomen verglichen mit primären Glioblastomen als herunterreguliert herausstellten. Es wurde hierbei vermutet, dass Rezidiv-Glioblastome vermutlich Resistenzmechanismen gegenüber der TMZ Therapie entwickelt haben könnten, beispielsweise durch eine gesteigerte *MGMT* Expression. Darum galt es, das Verhältnis der miRNAs *hsa-miR-324-3p* und *hsa-miR-93-3p* zur *MGMT* Expression zu untersuchen.

Zusammenfassend ergab sich aus diesen Vorarbeiten die Erkenntnis, dass es weitere, noch nicht publizierte miRNAs gibt, die eine bioinformatisch vorhergesagte Bindungsstelle zur 3'-UTR des *MGMT* Promotor besitzen und zusätzlich eine inverse Korrelation zur *MGMT* mRNA Expression in *MGMT* Promotor-unmethylierten Glioblastomen aufweisen. Diese drei miRNAs, *hsa-miR-149-3p*, *hsa-miR-345-5p* und *hsa-miR-491-5p* könnten somit potenziell die *MGMT* Expression in Glioblastomen regulieren.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, welche miRNAs die *MGMT* Expression in *MGMT* Promotor-unmethylierten Glioblastomen regulieren und somit die Prognose, Diagnostik oder Therapie vom bösartigsten primären Hirntumor beeinflussen können.

Hierzu wurden Vorläufer-miRNAs von fünf Kandidaten-miRNAs in zwei verschiedenen *MGMT* Promotor-unmethylierten Glioblastomzelllinien transfiziert. Anschließend erfolgte eine Bestimmung der *MGMT* mRNA und der *MGMT* Proteinexpression, um zu schauen, ob eine miRNA Überexpression eine *MGMT*-Expressionshemmung herbeiführt.

Folgend galt es herauszufinden, über welchen Mechanismus eine miRNA bedingte *MGMT*-Expressionshemmung erfolgt. Hierfür wurde die 3'-UTR vom *MGMT* Promotor bioinformatisch auf direkte miRNA-Bindungsstellen untersucht und die vorhergesagte Bindung anschließend *in vitro* mit Hilfe eines 3'-UTR-Luciferase-Reportergen-Assays experimentell überprüft.

Das dritte Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob die Überexpression einer *MGMT*-regulierenden miRNA die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber einer TMZ-Therapie erhöht und somit die Glioblastomtherapie positiv beeinflusst.

Anschließend wurden noch die funktionellen Effekte der *MGMT*-regulierenden miRNA auf Glioblastomzellen untersucht. Es wurde untersucht, ob die Apoptose-Aktivität, die Zellproliferationsrate und Zellvitalität beeinflusst durch Überexpression einer der *MGMT*-regulierenden Kandidaten miRNAs moduliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Humane Zelllinien

Die Glioblastomzelllinien T98G und A172 wurden von der *American Type Culture Collection* aus Manassas, VA, USA bezogen. Die Glioblastomzelllinien LN-18 und LNT-229 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Michael Weller (Zürich, CH) mit Genehmigung von Frau Dr. Monika Hegi (Lausanne, CH) zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Vorläufer-miRNA Moleküle und Oligonukleotide

In dieser Arbeit wurden folgende humane *Pre-miRTM miRNA Precursor* (pre-miRNA) und Negativkontrolle (*pre-miR-NC1*) verwendet (Tabelle 1). Die pre-miRNAs und Negativkontrolle wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham, M.A., USA, bezogen.

Tabelle 1: Verwendete miRNAs.

Name	miRBase Nummer	Sequenz	Katalognummer
<i>hsa-miR-149-3p</i>	MI0000478	AGGGAGGGACGGGGGCUGUGC	PM12877
<i>hsa-miR-345-5p</i>	MI0000825	GCUGACUCCUAGUCCAGGGCUC	PM12733
<i>hsa-miR-491-5p</i>	MI0003126	AGUGGGGAACCCUCCAUGAGG	PM11479
<i>hsa-miR-324-3p</i>	MI0000813	ACUGCCCCAGGUGCUGCUGG	PM12969
<i>hsa-miR-93-3p</i>	MI0000095	ACUGCUGAGCUAGCACUCCCCG	PM12787
Cy3 TM Dye-Labeled Pre-miR Negative Control			AM17120

Tabelle 2 zeigt die verwendeten Oligonukleotide (*Primer*), die vom Hersteller Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA synthetisiert wurden.

Tabelle 2: Verwendete Primer.

Gen Symbol	Accession number	Sequenz Forward Primer	Sequenz Reverse Primer	Größe Amplikon [bp]	Annealing Temperatur [°C]

MGMT	NG_052673	5' cgaataaaagctcctgggca 3'	5' gaactcttcgatagcctcggg 3'	151	60
ARF1	NM_00102 4227	5' gaccacgatcctctacaagc 3'	5' tcccacacagtgaagctgatg 3'	111	60

Für die Expressionsanalyse von miRNAs wurden die in Tabelle 3 genannten *LNATM PCR Primer Sets* von Qiagen, Venlo, NL, verwendet.

Tabelle 3: *LNATM PCR Primer Sets*.

Name	Katalognummer
<i>hsa-miR-149-3p</i>	204093
<i>hsa-miR-345-5p</i>	204589
<i>hsa-miR-491-5p</i>	204695
<i>hsa-miR-324-3p</i>	204303
<i>hsa-miR-93-3p</i>	204470
U6 snRNA	203907

2.1.3 Antikörper

Die für *Western Blot* Analysen verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4 aufgeführt. Der primäre Antikörper wurde jeweils nach drei und der sekundäre Antikörper jeweils nach einer Anwendung verworfen.

Tabelle 4: Verwendete Antikörper.

Name	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
MGMT (rabbit)	1:500 in 5% BSA in TBS-T	2739	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
β-Actin (rabbit)	1:1000 in TBS-T	Ab8227	Abcam plc, Cambridge, UK
β-Actin (rabbit)	1:1000 in 5% BSA in TBS-T	4967	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG (H + L), 0.5 mg	1:5000 in TBS-T (zur Detektion von MGMT) 1:10000 in TBS-T (zur Detektion von β -Actin)	926-32211	LI-COR Biotechnology, Lincoln, NE, USA.

2.1.4 Bakterien

Es wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH5 α (*E. coli*) mit folgendem Genotyp verwendet: supE44, lacU169 (F 80lacZ M15), hsdR17, recA, endA1, gyrA96, thi-1, relA1 [122].

2.1.5 Zellkulturmedien, Reagenzien, Enzyme, Kits

Zellkulturmedien, Reagenzien, Enzyme und Kits, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in der Tabelle 5 zu finden.

Tabelle 5: Verwendete Zellkulturmedien, Reagenzien, Enzyme und Kits.

Name	Katalognummer	Hersteller
20X Bovine Serum Albumin (ultrapure, non-acetylated) (1 mg/ml)	11733038	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Caspase-Glo® 3/7 Assay	G8093	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent)	11 669 915 001	Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, MO, USA
CellTiter-Glo® Luminescent	G7571	Promega Corporation, Madison, WI, USA
cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	11836170001	Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, MO, USA
Dual-Glo® Luciferase Assay System	E2940	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Dulbecco's Balanced Salt Solution	14190094	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium	41965039	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Fetal Bovine Serum	10270-106	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Lipofectamine® 2000 Reagent	11668019	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Midori Green Advance	MG04	NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Düren, DE
miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR	203301	Qiagen, Venlo, NL
my-Budget DNA-Leiter, 1 kp	85-1000-010	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, DE

my-Budget DNA-Leiter, 100bp	85-2150-050	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, DE
my-Budget dNTP-Mix	80-85010250	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, DE
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium	31985062	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 – 180 kDa	26616	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	15140122	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
peqGOLD Plasmid Miniprep I (Classic Line)	12-6942	VWR International, Darmstadt, DE
Pierce BCA Protein Assay Kit	23225, 23227	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	11733038	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
psiCHECK™-2 Vector	C8021	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Random Hexamers (0,5 µg/µL)	26-4000-03	Gene Link, Inc., Hawthorne, NY, USA
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µL)	EO0381	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ROX Reference Dye	11733038	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SuperScript™ II Reverse Transcriptase (200 U/µl) inklusive: 0,1 M DTT, 5X First-Strand Buffer	18064-022	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Taq DNA Polymerase, recombinant inklusive: 10X PCR buffer, Magnesium Chloride, 50 mM	10342020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TRIzol® Reagent	15596026	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Trypsin-EDTA (0,05%)	25300054	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Universal Human Reference RNA	740000-41	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

2.1.6 Lösungen und Chemikalien

Die Tabelle 6 führt die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen auf.

Tabelle 6: Verwendete Lösungen.

Name	Zusammensetzung
1 x MES Gel-Laufpuffer	50 mM MES (2-(N-Morphino) Ethansulfonsäure) 50 mM Tris-Base 0,1 % (w/v) SDS 1 mM EDTA
1 x TAE	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA
1 x TBS-T	26 mM Tris 140 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween-20
1 x Transferpuffer	24 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
4 x Probenpuffer ("Laemmli"-Puffer)	100 mM Tris, pH 6,8 6 % (w/v) SDS 40 % (v/v) Glycerol 4 % (v/v) β -Mercaptoethanol etwas Bromphenolblau
Ladungspuffer	30 % (v/v) Glycerol 0,025 % (w/v) Bromphenolblau 0,025 % (w/v) Xylencyanol
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton/Pepton aus Casein 0,5 % (w/v) Hefextrakt 1 % (w/v) NaCl 1,5 % (w/v) Agar-Agar
Lysepuffer	50 mM Tris-Cl, pH 8,0 150 mM NaCl 0,5 % (v/v) TritonX-100

	0,5 % (w/v) DOC (Deoxycholate)
Ponceau S	5% (v/v) Essigsäure 0,1 % (w/v) Ponceau S

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Verwendete Chemikalien.

Name	Reinheitsgrad	CAS Nummer	Bestellnummer	Hersteller
2-(N-Morphino) Ethansulfonsäure (MES)	>99 %		4259.4	Carl Roth, Karlsruhe, DE
2-Mercaptoethanol	99 %	60-24-2	M3148-100ML	Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, MO, USA
2-Propanol	≥99,5 %	67-63-0	CP41.1	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Agar-Agar		9002-18-0	2266.1	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Agarose Standard		9012-36-6	38103	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Albumin Fraktion V, proteasefrei	≥98 %	90604-29-8	T844.4	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Chloroform		67-66-3	1024451000	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Deoxycholsäure Natriumsalz	≥98,0 %	302-95-4	30970	Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, MO, USA
Essigsäure, 100 %			3738	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethanol absolute	≥99,8 %	64-17-5	20821.330	VWR International, Darmstadt, DE
Ethanol euro denaturiert 70% TechniSolv®	≥66,9 %	64-17-5	84858.360	VWR International, Darmstadt, DE
Ethylendiamin- tetraessigsäure (EDTA)			CN06.3	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Glycerol			24397.296	VWR International, Darmstadt, DE
Glycin	≥99 %	56-40-6	3790.3	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Hefeextrakt		8013-01-2	2363.2	Carl Roth, Karlsruhe, DE

Methanol	≥99,5 %	67-56-1	CP43.4	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid	≥99 %	7647-14-5	P029.3	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ponceau S			P-3504	Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, MO, USA
SDS-Pellets	≥99 %	151-21-3	CN30.2	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Temozolomide	≥99%	85622-93-1	sc-203292	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, TX, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethane		77-86-1	1083872500	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Triton X-100	100 %		3051.3	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Trypton/Pepton aus Casein		91079-40-2	8952.2	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tween-20		9005-64-5	P5927	Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, MO, USA
Xylencyanol Farblösung			B3269	Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, MO, USA

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Verwendete Verbrauchsmaterialien sind der Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Name	Katalognummer	Hersteller
Cell Culture Microplate, 96 Well, PS, F-Bottom, (Chimney Well), µclear®, Black, Cellstar®, Tc, Lid With Condensation Rings, Sterile, 8 Pcs./Bag	655090	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
CELLSTAR® Centrifuge Tubes, 15 ml	188271	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Corning® Cell Lifter	3008	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Corning® Costar® Stripette® capacity 10 ml	CLS4488	Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, MO, USA
Corning® Costar® Stripette® capacity 2 ml	CLS4486	Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, MO, USA

Corning® Costar® Stripette® capacity 25 ml	CLS4489	Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, MO, USA
Corning® Costar® Stripette® capacity 5 ml	CLS4487	Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, MO, USA
Eppendorf Combitips advanced®	0,1 ml: 0030089405 1,0 ml: 0030089430 5 ml: 0030089456	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 0.5 mL	0030121023	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1.5 mL	0030120086	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Falcon® 50mL High Clarity PP Centrifuge Tube	352070	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL	4346906	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Nitrocellulose Blotting Membrane	10600001	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, DE
Nunc MicroWell 96-Well Microplates	167008	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Nunc™ zellkulturbehandelte EasYFlasks™, 75 cm²	156499	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Nunc™ Zellkultur-Multischalen, 6 Wells	140675	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Plus Gel, 1,5 mm x 10 Well	NP0335BOX	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TipOne® Filter Tips	10 µl: 10S1120-3810-C 20 µl: S1123-1810-C 100 µl: S1123-1840-C 200 µl: S1120-8810-C 1000 µl: S1126-7810-C	STARLAB GmbH, Hamburg, DE
TipOne® Pipette Tips	10 µl: S1110-3800-C 200 µl: S1111-1800-C 1000 µl: S1111-6800-C	STARLAB GmbH, Hamburg, DE
VWR® Disposable Pipetting Reservoirs	89094-664	VWR International. West Chester, PA, USA
Zellkulturschalen, Nunc™	734-2043	VWR International. West Chester, PA, USA

2.1.8 Geräte

In der Tabelle 9 sind die Geräte aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kamen.

Tabelle 9: Verwendete Geräte.

Produktname	Bezugsquelle/Hersteller
Biometra TRIO 48	Analytik Jena, Jena, DE
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Odyssey CLx Infrarot Image System	LI-COR Biotechnology, Lincoln, Nebraska, USA.
Paradigm 32250155	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
StepOnePlus™ Real-Time PCR System 4376600	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Quantum Capture ST4	Vilber, Eberhardzell, Deutschland
Vi-CELL XR	Beckman Coulter, Brea, CA, USA

2.1.9 Computer-Software und Auswerteprogramme

Die verwendete Computer-Software und Auswerteprogramme sind in Tabelle 10 dargelegt.

Tabelle 10: Verwendete Computer-Software und Auswerteprogramme.

Programm	Firma
ChemDraw Professional 16 Individual ASL SN Win	PerkinElmer, Waltham, USA
GraphPad Prism 9.0.0	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Multimode Analysis Software, Version 3.3.0.9	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Serial Cloner, Version 2.6.1	<i>Freeware</i> , Franck Perez, Serial Basics
Software Image Studio, Version 2.1.10	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
StepOne™ Software v2.3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vi-CELL XR 2.03	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Quantum Capture ST4	Vilber, Eberhardzell, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die T98G, LN-18, A172 und LNT-229 Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) versetzt mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (HiFCS) und 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin (P-S) ausgesät und bei 37°C in einer mit 5 % CO₂ angereicherten feuchten Atmosphäre kultiviert. Zweimal pro Woche erfolgte eine Passagierung der Zellen. Hierbei wurden die Zellen mit 10 ml D-PBS gewaschen, 2 ml Trypsin-EDTA zugegeben und zur Ablösung der Zellen vom Flaschenboden für 3-5 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde 8 ml DMEM/HiFCS/P-S zugegeben und die gesamten 10 ml Zellsuspension in ein 15 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 5 ml DMEM/HiFCS/P-S gelöst und ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit Hilfe des Vi-CELL XR gezählt. Zur weiteren Kultivierung wurden folgende Zellzahlen in jeweils 10 ml DMEM/HiFCS/P-S in 75 cm² Zellkulturflaschen (EasYFlasks™) ausgesät: 5,25 x 10⁵ T98G, 5,0 x 10⁵ LN-18, 1,0 x 10⁶ A172 und 3,5 x 10⁵ LNT-229.

2.2.2 Transfektion von Glioblastomzellen mit pre-miRNAs

Jeweils 24 h nach Aussaat der Glioblastomzelllinien T98G, LN18 und A172 erfolgte die Transfektion mit spezifischen pre-miRNAs (siehe Tabelle 1) bzw. der pre-miR-NC1 Kontrolle mittels Lipofectamine® 2000 nach Angaben des Herstellers (Invitrogen).

Für nachfolgende *in vitro*-Analysen wurden verschiedene Zellkulturplattenformate verwendet, die unterschiedliche Zellzahlen und Mediummengen erforderlich machten (Tabelle 11).

Tabelle 11: Übersicht aller Methoden, welchen eine Transfektion vorausging.

Methode	Plattenformat der Zellkultur-Multischalen	Zelllinien	Zellzahl und Zielvolumen	Verwendete pre-miRNAs	Pre-miRNA Konzentration
Proteinextraktion	6-Well	T98G LN-18	150000 in 2 ml	<i>pre-miR-149-3p</i> <i>pre-miR-345-5p</i> <i>pre-miR-491-5p</i> <i>pre-miR-324-3p</i> <i>pre-miR-93-3p</i>	T98G: 50 nM LN-18: 25 nM

					<i>pre-miR-NC1</i>	
RNA-Extraktion	6-Well	T98G LN-18	150000 2 ml	in	<i>pre-miR-149-3p</i> <i>pre-miR-345-5p</i> <i>pre-miR-491-5p</i> <i>pre-miR-324-3p</i> <i>pre-miR-93-3p</i> <i>pre-miR-NC1</i>	T98G: 50 nM LN-18: 25 nM
Luciferase-Reportergen-Assay	96-Well	T98G LN-18 LNT-229	20000 100 µl	in	<i>pre-miR-149-3p</i> <i>pre-miR-NC1</i>	T98G: 50 nM LN-18: 50 nM LNT-229: 50 nM
Zellproliferations-Assay	96-Well	T98G LN-18 A172	10000 100 µl	in	<i>pre-miR-149-3p</i> <i>pre-miR-NC1</i>	T98G: 25 nM, LN-18: 25 nM A172: 25 nM
Apoptose-Assay	96-Well	T98G LN-18 A172	10000 100 µl	in	<i>pre-miR-149-3p</i> <i>pre-miR-NC1</i>	T98G: 25 nM, LN-18: 25 nM A172: 25 nM
Zellvitalitäts-Assay	96-Well	T98G LN-18 A172	10000 100 µl	in	<i>pre-miR-149-3p</i> <i>pre-miR-NC1</i>	T98G: 25 nM, LN-18: 25 nM A172: 25 nM
TMZ Behandlung	96-Well	T98G LN-18	5000 in 100 µl		<i>pre-miR-149-3p</i> <i>pre-miR-NC1</i>	T98G: 25 nM, LN-18: 25 nM
TMZ Behandlung	6-Well	T98G LN-18	150000 2 ml	in	<i>pre-miR-149-3p</i> <i>pre-miR-NC1</i>	T98G: 25 nM, LN-18: 25 nM

Nach der Transfektion wurden die Zellen ohne Mediumwechsel bis zur weiteren Verwendung kultiviert (siehe 2.2.1 Zellkultur).

2.2.3 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion aus T98G und LN-18 Zellen erfolgte 72 h nach Transfektion mit synthetischen pre-miRNAs und der entsprechenden Kontrolle (*pre-miR-NC1*). Nach zweimaligem Waschen mit gekühltem D-PBS wurde 1 ml TRIzol® Reagent pro Well hinzugegeben. Die Zellen wurden mit TRIzol® in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Nach einer Zugabe von 200 µl Chloroform wurde das Reaktionsgefäß für 30 s mittels eines Vortex vermischt. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur fand eine 15-minütige Zentrifugation bei 12000 rpm und 4°C statt. Hierbei trennten sich Protein, DNA und RNA der Zellen auf. Die wässrige Lösung mit der darin enthaltenen RNA wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die pelletierte RNA wurde mit 1 ml 75% (v/v) Ethanol gewaschen und für 5 min bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurde die RNA für 10 min an der Luft getrocknet und dann in 50 µl RNase freiem H₂O gelöst. Um die Qualität und Quantität der RNA zu kontrollieren, wurde die extrahierte RNA in einem 1,5 % (w/v) Agarosegel visualisiert und die Konzentration mit dem NanoDrop 1000 Spectrophotometer bestimmt.

2.2.4 Semiquantitative RT-qPCR zur Detektion von miRNAs

Um zu überprüfen, ob die Transfektion der T98G und LN-18 Zellen mit synthetischen pre-miRNAs zu einer Überexpression der reifen miRNAs in den Zellen führt, erfolgte eine cDNA-Synthese mit anschließender qPCR (Abb. 7). Hierzu wurde die unter Kapitel 2.2.3 beschriebene extrahierte RNA auf 5 ng/µl verdünnt.



Abb. 7: Schematische Darstellung der RT-Erststrang Synthese mit dem *miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR Kit*.

Ein Poly-A-Schwanz wird an das 3'-Ende der reifen *micro ribonucleic acid* (miRNA) angehängt. Dadurch kann ein Poly-T *Primer* den ersten komplementären Strang mit Hilfe einer Reversen Transkriptase synthetisieren. Das *miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR Kit* ermöglicht somit die Synthese aller exprimierten miRNAs in einem Reaktionsansatz. Abbildung modifiziert nach Qiagen aus *Instruction manual, miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR Kit*, April 2015.

Mit dem für die cDNA-Synthese verwendeten *miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR Kit* (Qiagen), siehe Tabelle 12, wurde im ersten Schritt den miRNAs am 3'-Ende ein Poly-A-Schwanz angehängt. Ein Poly-T *Primer* nutzt diese Sequenz, um den ersten komplementären Strang mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (RT) zu synthetisieren. Der Vorteil dieser Methode liegt in einer unspezifischen Erststrang cDNA-Synthese, wodurch erspart wird, pro miRNA einen eigenen Reaktionsansatz zu benötigen. Des Weiteren sind miRNAs kurze RNA Stränge mit einer Länge von ca. 22 nt – dies erschwert die Bindung

des reversen *Primers* und wurde in diesem Kit durch die Verlängerung des miRNA-Stranges mit dem Poly-A-Schwanz gelöst.

Tabelle 12: Einfacher Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese.

	Volumen [μ l]
5 x Reaktionspuffer	2,00
Nuklease freies H₂O	2,00
Enzym Mix	1,00
RNA (5 ng/μl)	5,00
Volumen gesamt	10,00

Die Ligation des Poly-A-Schwanzes und die Erststrang cDNA-Synthese erfolgte unter den in Tabelle 13 angegebenen Bedingungen.

Tabelle 13: Programm für die cDNA-Synthese.

Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min]
60	42
95	5
4	∞

Anschließend wurde die cDNA im Verhältnis 1:38 mit Milli-Q H₂O verdünnt.

Dieser Erststrang cDNA-Synthese folgte die semiquantitative RT-qPCR, siehe Tabelle 14. Hierbei wird in Echtzeit eine Quantifizierung der zu untersuchenden cDNA vorgenommen. Dies geschieht durch die Messung des Fluoreszenz Signals des interkalierenden Farbstoff Platinum SYBR Green mittels des StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Der Farbstoff bindet an die zu untersuchende DNA (interkalieren), sodass bei jedem Vervielfältigungsschritt der DNA die Menge an interkalierendem Farbstoff steigt. Das Fluoreszenz Signal ist somit proportional zur DNA-Konzentration, welche in jedem Zyklus durch die Amplifikationsreaktion wächst. Von jeder Probe wurden zwei technische Replikate verwendet, bei denen getrennt die Expression des Ziel- und Referenzgens gemessen wurden. Mit der *StepOne™ Software v2.3* wird die Auswertung der Messdaten anhand der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode [123] durchgeführt.

Zum Nachweis der jeweils transfizierten miRNA wurden die entsprechenden *LNATM PCR Primer Sets* eingesetzt. Als Referenz wurde die U6 snRNA verwendet. Als Kalibrator, um eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Versuchsdurchläufen zu gewähren, diente die *Universal Human Reference RNA (HU)*.

Tabelle 14: Einfacher Reaktionsansatz für die semiquantitative RT-qPCR.

	Volumen [μ l]
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	5,00
ROX Reference Dye	0,20
LNA TM PCR primer set, UniRT	1,00
cDNA	3,80
Volumen gesamt	10,00

Das verwendete PCR Programm ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Verwendetes PCR-Programm.

Zyklen	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min]
1	95	10,00
40	95	0,20
	60	10,00

2.2.5 Semiquantitative RT-qPCR zur Detektion von proteinkodierenden Genen

Um die *MGMT* mRNA Expression in miRNA transfizierten Zellen zu detektieren, wurde eine semiquantitative RT-qPCR durchgeführt.

Für die cDNA-Synthese wurde jeweils 1 μ g der RNA aus den mit synthetischen pre-miRNAs transfizierten Zellen auf 12,2 μ l Volumen mit RNase freiem H₂O eingestellt, für 5 min bei 70 $^{\circ}$ C inkubiert und kurz auf Eis gekühlt. Anschließend wurde der in Tabelle 16 beschriebene Reaktionsansatz hinzugegeben, die Proben durch Hoch- und Runterpipettieren gemischt und kurz zentrifugiert.

Tabelle 16: Einfacher Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese.

	Volumen [μ l]
0,1 M DTT	0,16

RiboLock RNase Inhibitor (40 U/μL)	0,40
Bovine Serum Albumin (1 mg/ml)	0,68
Random Hexamers (0,5 μg/μL)	1,20
dNTP-Mix (25 nM)	1,00
SuperScript™ II Reverse Transcriptase (200 U/μl)	0,40
5X First-Strand Buffer	4,00
Volumen gesamt	7,84

Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese unter den in Tabelle 17 angegebenen Bedingungen in einem Biometra TRIO 48 Thermocycler.

Tabelle 17: Programm für die cDNA-Synthese.

Temperatur [°C]	Zeit [min]
50	42
10	80
4	∞

Die cDNA wurde anschließend 1:10 mit Milli-Q H₂O verdünnt und in die semiquantitative RT-qPCR eingesetzt Tabelle 18.

Tabelle 18: Einfacher Reaktionsansatz für die semiquantitative RT-qPCR.

	Volumen [μl]
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	12,50
ROX Reference Dye	0,50
<i>Forward Primer</i> (10 μM)	0,75
<i>Reverse Primer</i> (10 μM)	0,75
Milli-Q H₂O	5,50
cDNA	5,00
Volumen gesamt	25,00

Das verwendete PCR Programm für die semiquantitative RT-qPCR der cDNA ist in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Verwendetes PCR-Programm.

Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	95	10,00
40	95	0,25
	60	1,00

2.2.6 Proteinextraktion

Die Proteinextraktion erfolgte 72 h nach Transfektion der T98G bzw. LN-18 Zellen mit synthetischen pre-miRNAs. Die Zellen wurden zweimal mit je 1 ml gekühltem D-PBS gewaschen. Nach Zugabe von 400 µl Lysepuffer (versetzt mit einer Tablette *cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* pro 10 ml Lysepuffer) wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst und mit dem Lysepuffer in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 10000 rpm) wurde die DNA pelletiert und das Proteinlysate in ein frisches, vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert.

2.2.7 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem *Pierce BCA Protein Assay Kit* nach Anleitung des Herstellers (Thermo Fisher Scientific). In einem alkalischen Milieu kommt es hierbei zu einer zweistufigen Reaktion, bei der im ersten Schritt im Rahmen einer Chelatierung Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduziert wird. Diese Reaktion entspricht der Biuret Reaktion. Anschließend reagiert das Kupferion mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure, wodurch ein neuer, lila farbiger Chelatkomplex entsteht. Die Farbintensität des Chelatkomplexes, welche mit dem Proteingehalt linear korreliert, wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm mit dem Paradigm und *Multimode Analysis Software* (Beckmann Coulter) gemessen. Die untersuchten Proben wurden basierend auf einer Standardreihe mit folgenden Konzentrationen einer Rinderserumalbuminlösung (BSA) quantifiziert: 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 µg/ml.

2.2.8 Western Blot Analyse

Zum Nachweis einer veränderten Proteinexpression in den mit synthetischen pre-miRNAs transfizierten Zellen wurden *Western Blot* Analysen verwendet. Dabei werden Proteine nach

elektrophoretischer Auftrennung auf eine Membran transferiert und durch eine Antigen-Antikörper-Reaktionen nachgewiesen. Hierbei wurden 15 µg der Proteinproben in einem Verhältnis von 4:1 mit Laemmli-Puffer für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte in 4-12% Bis-Tris Fertiggele (Novex) in 1xMES Puffer für 65 min bei 160 V. Anschließend wurden die Proteine aus dem Gel luftblasenfrei auf eine *Nitrocellulose Blotting Membrane* transferiert. Hierzu wurden das das Gel und die *Nitrocellulose Blotting Membrane* in einer gekühlten Kammer gefüllt mit 1xTransferpuffer platziert, in der der Proteintransfer bei 150 min und 240 mA erfolgte. Der erfolgreiche Transfer der Proteine auf die *Nitrocellulose Blotting Membrane* wurde durch Färben der Membran mit einer Ponceau S Lösung überprüft. Danach wurde die Membran mit 5 % BSA in TBS-T für eine Stunde geblockt. Die primären Antikörper wurden für 12 Stunden bei 8°C auf die Membran hybridisiert. Anschließend wurde die Membran 3 x 10 min mit TBS-T gewaschen, bevor der entsprechende fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur und Dunkelheit auf die Membran kam. Anschließend wurde die Membran 3 x 10 min mit TBS-T gewaschen und dann die Proteinbanden mittels der Software *Image Studio, Version 2.1.10* visualisiert und quantifiziert. Alle verwendeten primären und sekundären Antikörper Verdünnungen können Tabelle 4 entnommen werden.

2.2.9 Klonierung

Zum Nachweis einer direkten Bindung von *hsa-miR-149-3p* an die 3'-UTR von *MGMT* diente ein 3'-UTR-Luciferase-Reporter-Gen-Assay. Hierbei wurde der Vektor psiCHECK™-2 von Promega verwendet, vergleiche hierzu Abb. 8.

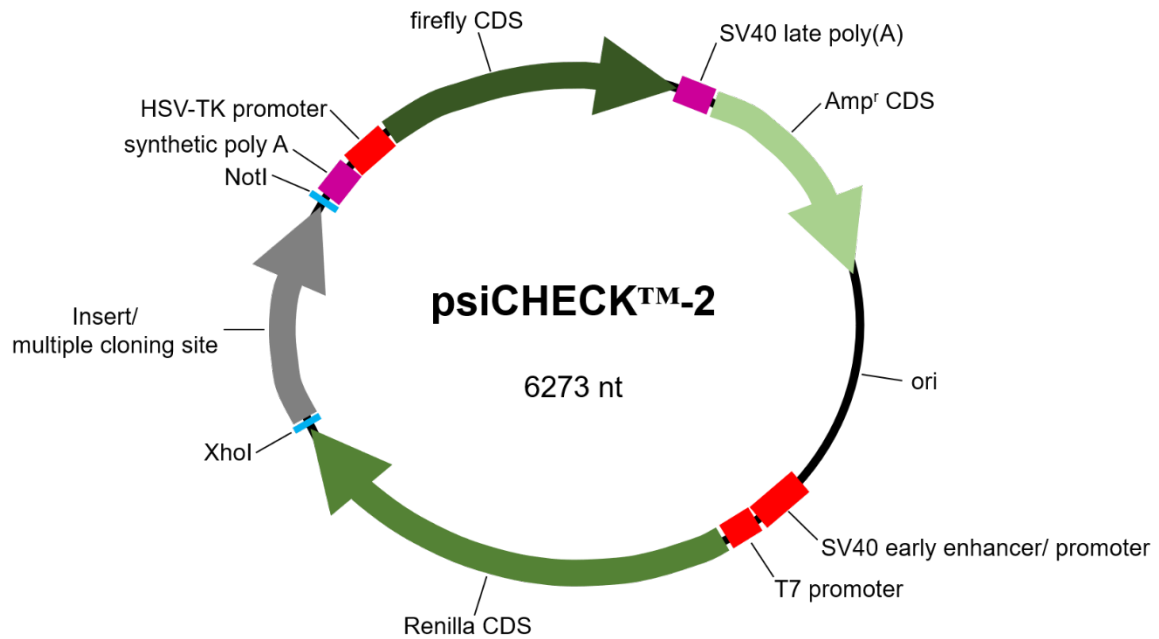


Abb. 8: Schematische Darstellung des psiCHECK™-2 Vektors von Promega.

Der dargestellte Vektor hat eine Größe von 6273 Nucleotiden (nt) und hat zwei Reportergene: die *Renilla* Luciferase und die *firefly* Luciferase. In Ableserichtung der *Renilla* Luciferase Sequenz kann das Zielgen (Insert) in der multiplen Klonierungsstelle (*multiple cloning site*) inseriert werden, indem man die zwei dargestellten Restriktionsenzyme verwendet (NotI, XhoI). Der Vorteil des psiCHECK™-2 Vektors gegenüber anderen herkömmlichen Vektoren liegt darin, dass das Reportergen *firefly* Luciferase konstitutiv exprimiert und so eine Normalisierung und bessere Vergleichbarkeit des Experiments ermöglicht wird. (CDS: *coding sequence*, HSV-TK promoter: *Herpes simplex virus thymidine kinase promoter*, Amp^r: Ampicillin Resistenzgen, SV40: Simian-Virus 40, ori: *origin of replication*)

Bioinformatisch wurde eine Bindungsstelle zwischen der *seed sequence* von *hsa-miR-149-3p* und der 3'-UTR von *MGMT* vorhergesagt, diese Bindungsstelle wurde als *Insert* verwendet (Abb. 9). Der psiCHECK™-2 Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen XhoI und NotI geschnitten und verschiedene Vektorkonstrukte durch Ligation der in Abb. 9 gezeigten *Inserts* in den Vektor generiert. Das Konstrukt psiCHECK2/miR-149-3p/bs-wt enthält die Wildtypsequenz der vorhergesagten Bindungsstelle in der 3'-UTR von *MGMT*. Die Konstrukte psiCHECK2/miR-149-3p/bs-mut1 und psiCHECK2/miR-149-3p/bs-mut2 enthalten veränderte Bindungsstellen, sodass keine Bindung der *hsa-miR-149-3p* an die klonierte Sequenz erfolgen sollte (Abb. 9). Die Klonierung des *Inserts* in den

psiCHECK™-2 Vektor und die Validierung der Sequenzen erfolgte durch die Firma Eurofins.

```

hsa-miR-149-3p                3' – CGTGTCGGGGGCAG GGAGGGA – 5'
psiCHECK2/miR-149-3p/bs-wt    5' – ctcgagGCCCCATCCCCACCATG CCTCCCTTCCTgcggccgc – 3'
psiCHECK2/miR-149-3p/bs-mut1  5' – ctcgagGCCCCATCCCCACCATG GGAGGGTTCCTgcggccgc – 3'
psiCHECK2/miR-149-3p/bs-mut2  5' – ctcgagGCCCGTCCGGAGGAAGGGAGGGATCCCTgcggccgc – 3'

```

Abb. 9: Nukleotidsequenz der verwendeten DNA-Fragmente zur Klonierung in den psiCHECK™-2 Vektor.

Dargestellt ist die Nukleotidsequenz der *hsa-miR-149-3p* und deren bioinformatisch vorhergesagte Bindungsstelle in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) von *MGMT* (psiCHECK2/miR-149-3p/bs-wt). Die Bindung einer miRNA erfolgt typischerweise zwischen der *seed sequence* der miRNA und des Zielgens (siehe orangene Markierung). psiCHECK2/miR-149-3p/bs-wt, *MGMT* 3'-UTR Wildtypsequenz; psiCHECK2/miR-149-3p/bs-mut1 und psiCHECK2/miR-149-3p/bs-mut2, Konstrukte mit mutierter *hsa-miR-149-3p* Bindungsstelle. (MGMT: O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase)

Die Vervielfältigung des Vektor-Insert-Konstrukts erfolgte durch Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien. Hierzu wurden kompetente *E. coli* bei 0° - 4°C aufgetaut. Anschließend wurde 1 µl des Vektor-Insert-Konstrukts zu 50 µl kompetenten *E. coli* hinzugegeben und für 30 min bei 0°-4°C gekühlt. Es folgte ein 30 s langer Hitzeschock bei 42°C. Die transformierten *E. coli* wurden in 250 µl LB-Medium angeimpft. 200 µl davon wurden auf Zellkulturschalen (Nunc™) mit LB Medium als Nährboden und Ampicillin ausgesät und für 12 h bei 37°C inkubiert. Eine Kolonie wurde in 3 ml LB-Medium mit 0,1 mg/ml Ampicillin gegeben und erneut für 12 h bei 37°C inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem *peqGOLD Plasmid Miniprep I* (Classic Line) Kit nach Angaben des Herstellers (VWR International).

2.2.10 Kotransfektion von synthetischen pre-miRNAs und Vektoren

Die Kotransfektion von Glioblastomzelllinien mit synthetischen pre-miRNAs und den psiCHECK™-2 Vektoren fand 24 h nach der Zellaussaat statt. Hierbei erfolgte die Durchführung der Transfektion wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, nur dass zusätzlich noch 200 ng des psiCHECK™-2 Vektors (siehe Tabelle 20) transfiziert wurde.

Tabelle 20: Beispielhafter Einfachansatz der Kotransfektion (miRNA).

	Volumen [µl]
pre-miRNA (50 nM)	0,50
psiCHECK™-2 Vektor mit Insert (200 ng)	0,50

Opti-MEM®	24,00
Volumen gesamt	25,00

Der Ansatz wurde mit vier verschiedenen Vektoren durchgeführt: mit den Vektor-Insert-Konstrukten psiCHECK2/miR-149-3p/bs-wt, psiCHECK2/miR-149-3p/bs-mut1, psiCHECK2/miR-149-3p/bs-mut2 und mit dem psiCHECK™-2 Vektor ohne Insert (psiCHECK2/leer) (Abb. 9).

2.2.11 Luciferase-Reportergen-Assay in transfizierten Glioblastomzelllinien

Ziel des Luciferase-Reportergen-Assays war der Nachweis einer direkten Bindung der *hsa-miR-149-3p* an die 3'-UTR von *MGMT*. Die direkte Bindung einer miRNA an die klonierte Bindungsstelle im psiCHECK™-2 Vektor verhindert die Translation der *Renilla*-Luciferase (Abb. 10) durch Degradierung der mRNA. Dadurch entsteht, im Vergleich zur *pre-miR-NC1* transfizierten Zelllinie, eine reduzierte Lumineszenz.

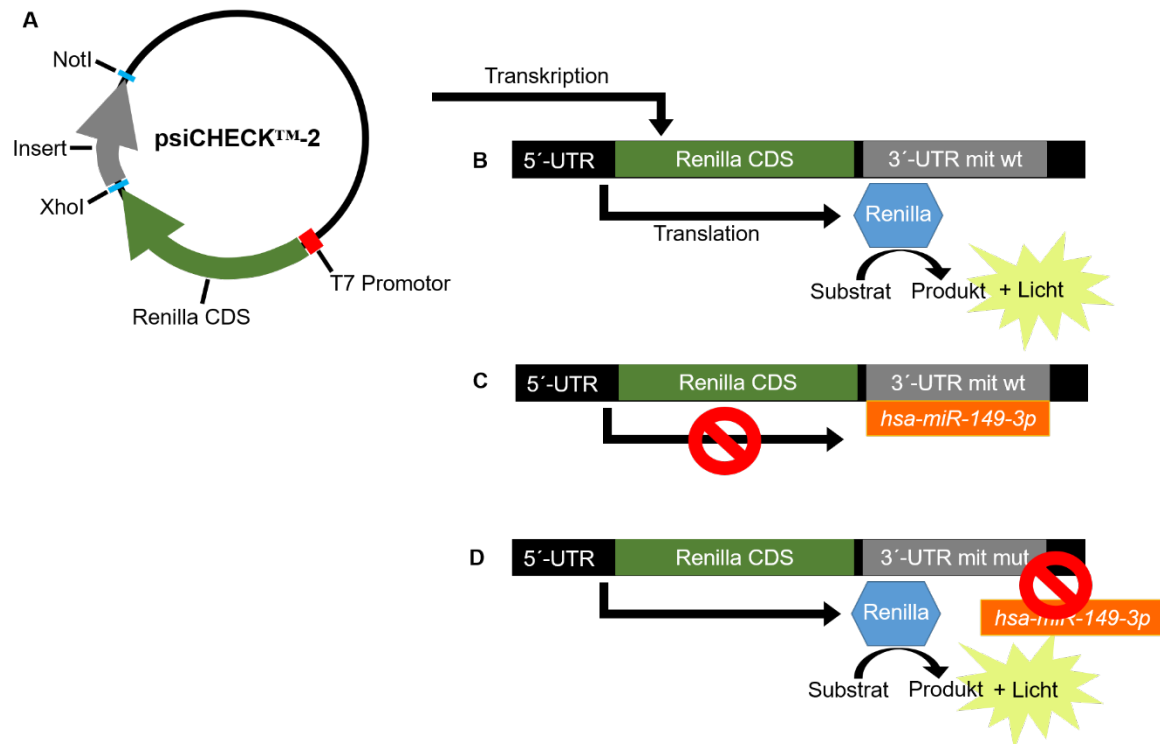


Abb. 10: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Luciferase-Reportergen-Assays.

Der Vektor wird durch Restriktionsenzyme geschnitten, sodass die Zielsequenz innerhalb der *multiple cloning site* inseriert werden kann (A). Das Vektorkonstrukt wird nach Transfektion in die Glioblastomzelllinien transkribiert (B) und eine funktionsfähige *Renilla* Luciferase gebildet. Die Luciferase katalysiert eine Reaktion, bei der Licht freigesetzt wird. Diese Lumineszenz wird dann photometrisch gemessen. (C) Bei einer Kotransfektion der Zellen mit dem Vektorkonstrukt psiCHECK2/miR-149-3p/bs-wt und *pre-miR-149-3p* Molekülen bindet die reife *hsa-miR-149-3p* an die komplementäre Bindungsstelle in der 3'-UTR der *Renilla*-mRNA und verhindert die Bildung der *Renilla* Luciferase. Die Lumineszenz ist im Vergleich zu (B) deutlich vermindert. (D) Ist die Bindungsstelle in der 3'-UTR mutiert, kann die miRNA nicht mehr binden und ein funktionsfähiges Protein wird gebildet. Der gemessene Lumineszenzwert ist mit dem in Ansatz (B) vergleichbar. (UTR: *untranslated region*, CDS: *coding sequence*, mut: mutiert, wt: Wildtyp)

48 h nach Kotransfektion wurde das Medium abgesaugt und anschließend 50 µl pro Well DMEM/HiFCS/P-S hinzugegeben. Die nächsten Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers mit dem *Dual-Glo® Luciferase Assay System* (Promega). Die jeweils mit dem Paradigm und der *Multimode Analysis Software* (Beckmann Coulter) gemessene Lumineszenz wurde im Verhältnis zur *firefly* Luciferase gesetzt, welche konstitutiv exprimiert wird.

2.2.12 Zellproliferation-Assay in transfizierten Glioblastomzelllinien

Die Bestimmung der Zellproliferationsrate in *pre-miR-149-3p* und *pre-miR-NC1* transfizierten Glioblastomzelllinien (T98G, LN-18 und A172) erfolgte 72 h nach Transfektion mit dem *Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent)* Kit von Sigma-Aldrich nach Angaben des Herstellers. Hierbei kommt es im Laufe der

Zellproliferation zum Einbau des Pyrimidin Analogons BrdU. Mittels spezifischer BrdU-Antikörper konnte mit einem ELISA ein lumineszierendes Signal generiert werden, welches mit dem Paradigm und der *Multimode Analysis Software* (Beckmann Coulter) gemessen wurde.

2.2.13 Apoptose-Assay in transfizierten Glioblastomzelllinien

Der Einfluss von miRNAs auf die Apoptoseaktivität in Promotor unmethylierten Glioblastomzelllinien wurde mit Hilfe des *Caspase-Glo® 3/7 Assay* von Promega untersucht. Hierzu erfolgte die Durchführung der Methode nach Angaben des Herstellers 72 h nach Transfektion mit *pre-miR-149-3p* und der Kontrolle *pre-miR-NC1*. Es kommt hierbei im Beisein von ATP und Sauerstoff zur Spaltung eines Substrats durch die Caspasen 3 und 7. Es entsteht ein lumineszierendes Produkt, dessen Signal mit dem Paradigm und der *Multimode Analysis Software* (Beckmann Coulter) gemessen werden kann. Die Stärke des lumineszierenden Signals ist proportional zur Menge an aktiver Caspase 3 und 7, sodass indirekt die apoptotische Aktivität in den untersuchten Zellen bestimmt werden kann.

2.2.14 Zellvitalitätsmessung in transfizierten Glioblastomzelllinien mit und ohne TMZ-Behandlung

Eine Untersuchung der Zellvitalität von *pre-miR-149-3p* und *pre-miR-NC1* transfizierten Glioblastomzelllinien (T98G, LN-18 und A172) erfolgte 72 h nach Transfektion. Es erfolgte ebenfalls eine Zellvitalitätsmessung 192 h nach Transfektion der TMZ-behandelten-Zelllinien T98G und LN-18 mit den *pre-miR-149-3p* und *pre-miR-NC1*. Mit dem *CellTiter-Glo® Luminescent* Kit von Promega kommt es abhängig vom ATP-Gehalt im jeweiligen Well der Zellkultur-Multischale zu einem lumineszierenden Signal. Unter der Annahme einer Korrelation des ATP-Gehalts zur Zellzahl kann somit indirekt die Anzahl vitaler Zellen bestimmt werden. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Promega) und wurde mit Hilfe des Paradigms und der *Multimode Analysis Software* (Beckmann Coulter) ausgewertet.

2.2.15 TMZ-Behandlung transfizierter Glioblastomzelllinien

Um herauszufinden, ob die Überexpression der *hsa-miR-149-3p* die TMZ Sensitivität von Glioblastomzellen beeinflusst, wurden die Zelllinien T98G und LN-18 mit *pre-miR-149-3p* und *pre-miR-NC1* als Kontrolle transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit

TMZ behandelt. Nach einer mikroskopischen Kontrolle der Zellen wurde das Medium abgesaugt und 100 µl TMZ gelöst in DMEM mit 1 % P-S appliziert. Es wurden folgende TMZ Konzentrationen 1, 125, 250, 500, 1000, 1500 und 2000 µM über eine gesamte Expositionsdauer von 192 h. Bei der Kontrolle wurde ebenfalls alle 24 h das Medium DMEM mit 1 % P-S ohne TMZ erneuert.

Es wurde auch eine andere Variante der TMZ Behandlung durchgeführt, bei der TMZ-bedruckte Platten verwendet wurden. Hierzu wurden die Zelllinien T98G und LN-18 mit *pre-miR-149-3p* und *pre-miR-NCl* als Kontrolle transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden mit 2 ml D-PBS pro Well gewaschen, 500 µl Trypsin-EDTA zugegeben und zur Ablösung der Zellen vom Flaschenboden für 3-5 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde 1,5 ml DMEM/HiFCS/P-S zugegeben und die je 2 ml Zellsuspension in ein 15 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 5 ml DMEM/HiFCS/P-S gelöst und ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit Hilfe des Vi-CELL XR gezählt. Von T98G und LN-18 wurden je 5000 Zellen pro Well in eine *Cell Culture Microplate, 96 Well, PS, F-Bottom* ausgesät, welche zuvor mit TMZ beschichtet wurde. Die Zellen wurden für 72 h inkubiert. Die Bedruckung der Platten mit 50, 70, 99, 138, 194, 272, 381, 535 und 750 µM TMZ (in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst) erfolgte freundlicherweise durch Viktoria Marquardt aus der Arbeitsgruppe Dr. Marc Remke, Kinderonkologie Düsseldorf unter Verwendung des D300e Digital Dispenser (Tecan).

2.2.16 Statistische Analyse

Alle statistischen Auswertungen wurden mit GraphPad Prism 9.0.0 durchgeführt. Hierbei erfolgten jeweils, sofern nicht anders erwähnt, zweiseitige, gepaarte Stichproben-t-Tests bei denen die Hypothese ab einem p-Wert von 0,05 verworfen wurde. In den Balkendiagrammen wird jeweils n als arithmetisches Mittel und die Standardabweichung (SD) dargestellt. Technische Replikate wurden gemittelt. Die Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) erfolgte unter Verwendung des negativen dekadischen Logarithmus der jeweiligen errechneten mittleren inhibitorischen Konzentration.

3 Ergebnisse

3.1 Auswahl der miRNAs und der Glioblastomzelllinien

Mit dem Ziel miRNAs herauszufinden, die die MGMT Expression in Promotor-unmethylierten Glioblastomen regulieren, wurden drei miRNAs ausgesucht (*hsa-miR-149-3p*, *hsa-miR-345-5p* und *hsa-miR-491-5p*). Diese stellten sich im Rahmen einer TCGA Analyse als invers mit der MGMT mRNA Expression korrelierend heraus. Ein zusätzliches Auswahlkriterium war, dass diese miRNAs noch nicht in der Literatur als MGMT expressionshemmend beschrieben wurden (siehe Vorarbeiten 1.4). Es wurden zusätzlich die miRNAs *hsa-miR-324-3p* und *hsa-miR-93-3p* in diese Arbeit einbezogen. Diese zwei miRNAs stellten sich als herunterreguliert in rezidierten Glioblastomen verglichen mit primären Glioblastomen heraus. Es wurde hierbei vermutet, dass rezidierte Glioblastome vermutlich einen Resistenzmechanismus der TMZ Therapie haben könnten, beispielsweise durch eine gesteigerte MGMT Expression. Darum galt es, das Verhältnis der miRNAs *hsa-miR-324-3p* und *hsa-miR-93-3p* zur MGMT Expression zu untersuchen.

Alle fünf genannten miRNAs wurden in den zwei Glioblastomzelllinien T98G und LN-18 überexprimiert mittels transienter Transfektion. T98G und LN-18 haben einen unmethylierten MGMT Promotor und exprimieren beide MGMT. T98G hat eine höhere MGMT Expression als LN-18 [55, 124-126].

3.2 miRNA Überexpression nach Transfektion von T98G und LN-18 Gliomzelllinien mit synthetischen pre-miRNA Molekülen

Um den Einfluss der fünf ausgewählten, potenziell *MGMT*-regulierenden miRNAs (*hsa-miR-149-3p*, *hsa-miR-345-5p*, *hsa-miR-491-5p*, *hsa-miR-324-3p*, *hsa-miR-93-3p*) auf die *MGMT* mRNA- und Proteinexpression zu bestimmen, wurden T98G und LN-18 Glioblastomzelllinien mit synthetischen pre-miRNA Molekülen transient transfiziert. Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurden die Expressionsniveaus der fünf miRNAs in T98G und LN-18 Glioblastomzellen nach Transfektion der entsprechenden synthetischen pre-miRNAs im Vergleich zu *pre-miR-NC1* transfizierten Zellen untersucht. Hierzu wurde zunächst die RNA aus den transfizierten Zellen extrahiert, eine semiquantitative RT-qPCR durchgeführt und die Expression der miRNAs mittels $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode bestimmt. Die miRNA-Expressionsniveaus wurden auf die Expression der U6 snRNA normalisiert und relativ zum Expressionsniveau in *pre-miR-NC1* transfizierten Zellen gesetzt (Abb. 11).

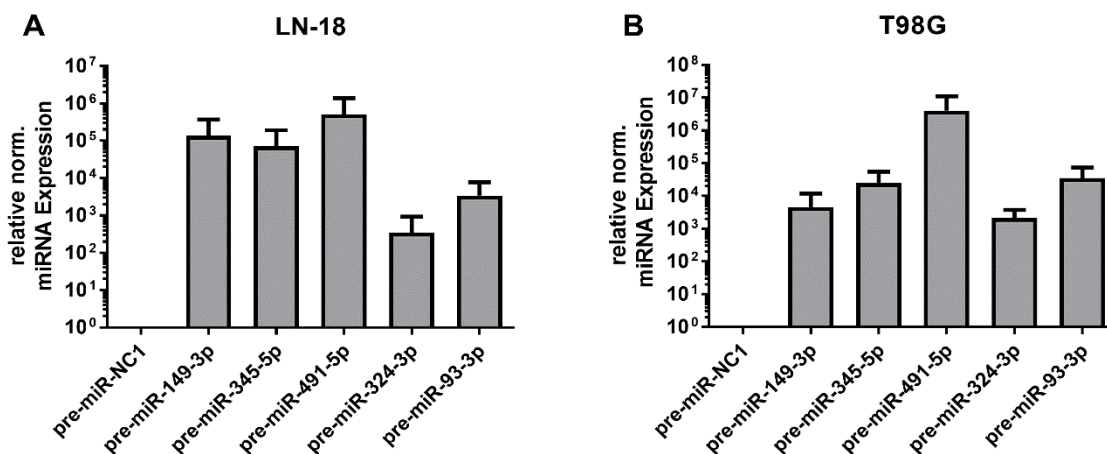


Abb. 11: Überexpression der fünf potenziell *MGMT*-regulierenden miRNAs in den Zelllinien LN-18 und T98G nach Transfektion der entsprechenden pre-miRNAs.

LN-18 (A) und T98G (B) wurden transient mit synthetischen pre-miRNAs in einer Konzentration von 25 nM (LN-18) bzw. 50 nM (T98G) transfiziert (n = 3). Nach RNA-Extraktion wurde eine semiquantitative RT-qPCR durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode. Hierbei diente die U6 snRNA als Referenzgen. Alle Expressionsniveaus wurden relativ zu *pre-miR-NC1* transfizierten Zellen dargestellt. Man beachte die deutliche Überexpression der fünf untersuchten miRNAs in beiden Zelllinien. (miRNA: *micro ribonucleic acid*, norm.: normalisiert)

In der Zelllinie LN-18 zeigte sich abhängig von der überexprimierten miRNA eine 100-fach (*hsa-miR-324-3p*) bis 10.000-fach (*hsa-miR-491-5p*) höhere Expression im Vergleich zu miR-NC1 transfizierten Zellen. In der Zelllinie T98G fand sich ebenfalls eine deutliche

Überexpression aller transfizierten miRNAs — abhängig von der überexprimierten miRNA 1000-fach (*hsa-miR-324-3p*) bis 100.000-fach (*hsa-miR-491-5p*) höher im Vergleich zu miR-NC1 transfizierten Zellen.

3.3 Einfluss der Überexpression der fünf potenziell *MGMT*-regulierenden miRNAs auf die Expression der *MGMT* mRNA

Um die Auswirkung der Überexpression der fünf potenziell *MGMT*-regulierenden miRNAs auf die *MGMT* mRNA-Expression in Glioblastomzellen zu ermitteln, wurden T98G und LN-18 Zellen mit synthetischen pre-miRNAs (*pre-miR-149-3p*, *pre-miR-345-5p*, *pre-miR-491-5p*, *pre-miR-324-3p*, *pre-miR-93-3p*) transient transfiziert. Nachfolgend wurde die RNA aus den transfizierten Zellen extrahiert, eine semiquantitative RT-qPCR durchgeführt und die *MGMT* mRNA Expression anhand der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode ermittelt. Das *MGMT* mRNA Expressionslevel wurde auf das Expressionslevel der *Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor (ARF1)* mRNA normalisiert, auf die Expression der Kalibratorprobe kalibriert und in Relation zum Expressionslevel der *MGMT* mRNA in *pre-miR-NC1* transfizierten Zellen gesetzt. Die Durchschnittswerte der *pre-miR-NC1*-transfizierten Zellen wurden gleich 1 gesetzt (Abb. 12).

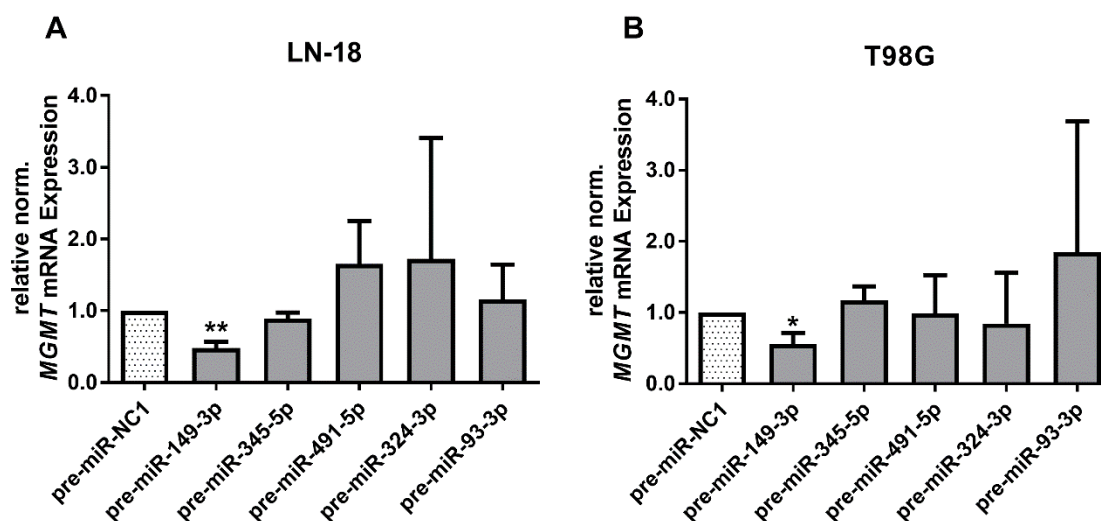


Abb. 12: Verminderte *MGMT* mRNA Expression in *hsa-miR-149-3p* überexprimierenden LN-18 und T98G Glioblastomzelllinien.

Eine semiquantitative RT-qPCR wurde zur Bestimmung der relativen mRNA Expression von O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (*MGMT*) in den mit der entsprechenden pre-miRNAs transfizierten LN-18 (A) und T98G (B) Zellen durchgeführt. Bei LN-18 (A) wurden die pre-miRNAs in einer Konzentration von 25 nM und bei T98G (B) von 50 nM transfiziert. Alle Expressionsniveaus wurden relativ zu *pre-miR-NC1* transfizierten Zellen dargestellt, wobei die Durchschnittswerte der *pre-miR-NC1*-transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt wurden. Der Balken stellt den jeweiligen Mittelwert aus drei biologischen Replikaten dar, die vertikale Linie repräsentiert die jeweilige Standardabweichung. Der gepaarte zweiseitige t-Test ($n = 3$, $p < 0,05$) zeigte für *pre-miR-149-3p* transfizierte Zellen eine signifikant niedrigere *MGMT* mRNA Expression in beiden Zelllinien. (mRNA: messenger ribonucleic acid, norm.: normalisiert, *: p-Wert $< 0,05$, **: p-Wert $< 0,01$)

Die *pre-miR-149-3p* transfizierten Glioblastomzellen zeigten eine Reduktion des *MGMT* mRNA Expressionslevel um $0,52 \pm 0,09$ bei LN-18 und um $0,44 \pm 0,16$ bei T98G im Vergleich zum Expressionslevel in kontrolltransfizierten Zellen. Dagegen zeigte weder LN-18 noch T98G Zellen nach Transfektion mit *pre-miR-345-5p*, *pre-miR-491-5p*, *pre-miR-324-3p* und *pre-miR-93-3p* einen signifikanten Unterschied des *MGMT* mRNA Expressionsniveaus verglichen mit den *pre-miR-NC1* transfizierten Zellen.

3.4 Einfluss der Überexpression der fünf potenziell *MGMT*-regulierenden miRNAs auf die Expression des *MGMT* Proteins

Um herauszufinden, welchen Einfluss die Überexpression der fünf miRNAs auf die *MGMT* Proteinexpression in Glioblastomzellen hat, wurden T98G und LN-18 Zellen mit synthetischen pre-miRNAs (*pre-miR-149 3p*, *pre-miR-345-5p*, *pre-miR-491-5p*, *pre-miR-324-3p*, *pre-miR-93-3p*) transient transfiziert. Mittels *Western Blot* Analyse wurde das *MGMT* Protein-Expressionsniveau bestimmt. Als Referenzprotein wurde das konstitutiv

exprimierte β -Actin verwendet. Durch Messung der Intensität der einzelnen Banden und dessen Normierung zur jeweiligen β -Actin Bande konnte das Ergebnis semiquantitativ im Verhältnis zu den *pre-miR-NC1* transfizierten Zellen evaluiert werden, wobei die Durchschnittswerte der *pre-miR-NC1*-transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt wurden (Abb. 13).

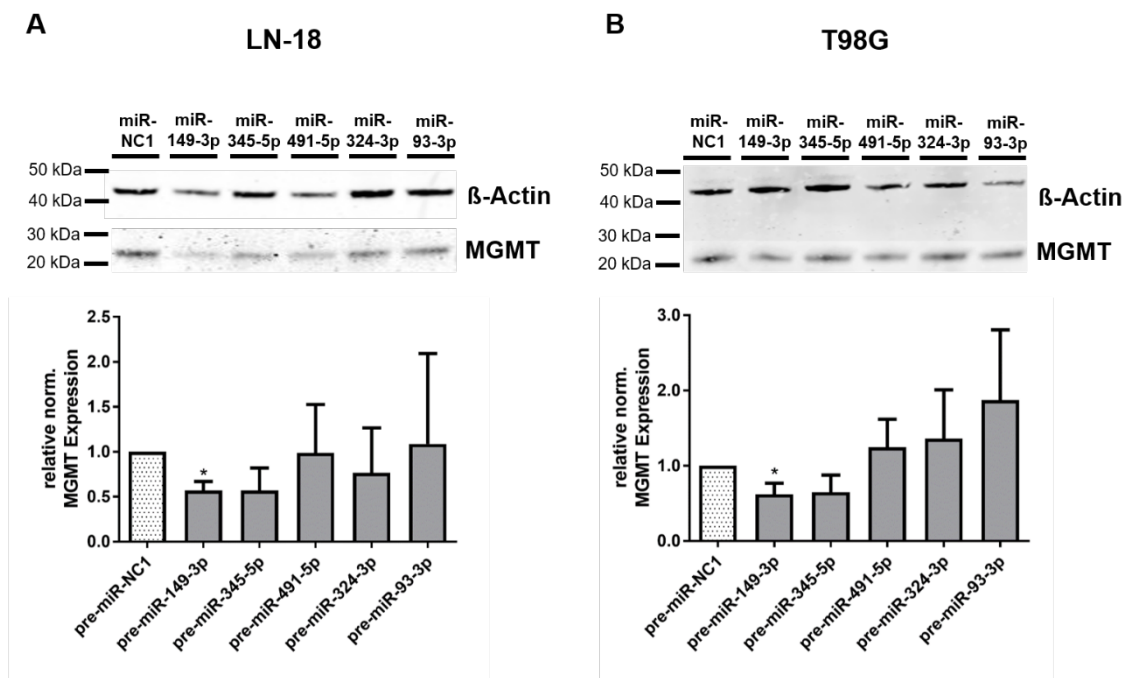


Abb. 13: Verminderte MGMT Proteinexpression nach *hsa-miR-149-3p* Überexpression in den Glioblastomzelllinien LN-18 und T98G.

Gezeigt wird hier eine *Western Blot* Proteinanalyse, welche den Effekt einer miRNA Überexpression auf die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) Proteinexpression in Glioblastomzellen visualisiert. Es wurden zwei Glioblastomzelllinien mit jeweils einer der fünf *pre-miRNAs* (*pre-miR-149-3p*, *pre-miR-345-5p*, *pre-miR-491-5p*, *pre-miR-324-3p*, *pre-miR-93-3p*) in einer Konzentration von je 25 nM bei LN-18 (A) und je 50 nM bei T98G (B) transfiziert. Im *Western Blot* konnte die Expression des Zielproteins MGMT mit dem Expressionsniveau des konstitutiv exprimierten Referenzproteins β -Actins verglichen werden. Der Expressionsunterschied von MGMT zu β -Actin in den transfizierten Zellen wurde mit dem Expressionsunterschied in den kontrolltransfizierten Zellen verglichen (*pre-miR-NC1*), wobei die Durchschnittswerte der *pre-miR-NC1*-transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt wurden. Hier dargestellt ist pro Zelllinie jeweils ein repräsentativer *Western Blot* und die quantitative Auswertung aus je $n = 3$ biologischen Replikaten. Die Balken in dem Diagramm stellen das arithmetische Mittel von $n = 3$ biologischen Replikaten, inklusive deren Standardabweichungen als vertikale Linien, dar. Der gepaarte zweiseitige t-Test zeigte eine signifikante MGMT Inhibierung durch *hsa-miR-149-3p* (A, B). (norm.: normalisiert, *: p-Wert < 0,05, kDa: Kilodalton)

Die Überexpression der *hsa-miR-149-3p* zeigte auf Proteinebene eine signifikante Reduktion der MGMT Expression um $0,43 \pm 0,10$ bei LN-18 und um $0,38 \pm 0,15$ bei T98G. Dagegen ließ sich in LN-18 und T98G Zellen nach Transfektion der vier anderen *pre-miRNAs* (*pre-miR-345-5p*, *pre-miR-491-5p*, *pre-miR-324-3p*, *pre-miR-93-3p*) kein

signifikanter Expressionsunterschied des MGMT Proteins verglichen mit den kontrolltransfizierten (*pre-miR-NC1*) Zellen nachweisen.

3.5 Nachweis einer direkten Bindung der *hsa-miR-149-3p* in der 3'-UTR des *MGMT* Promotors

Der 3'-UTR-Luciferase-Reportergen-Assay diente dem Nachweis einer direkten Interaktion der *hsa-miR-149-3p* mit der 3'-UTR von *MGMT*. Hierbei wurde eine Kotransfektion der Glioblastomzelllinien LN-18, T98G und LNT-229 mit dem psiCHECK™-2 Vektor-Konstrukt, welches entweder die Wildtyp-Bindungsstelle für die miRNA (psiCHECK2/miR-149-3p/bs-wt, siehe Abb. 8) oder aber eine mutierte Bindungsstelle (psiCHECK2/miR-149-3p/bs-mut1, psiCHECK2/miR-149-3p/bs-mut2, siehe Abb. 8) enthält und der *pre-miR-149-3p* bzw. *pre-miR-NC1* durchgeführt. Hierbei wurde zusätzlich die Zelllinie LNT-229 miteingeschlossen, da diese Glioblastomzelllinie einen methylierten *MGMT* Promotor hat und so die endogene MGMT Expression keinen Einfluss auf Ergebnisse haben konnte [126-128]. Anschließend konnte die Lumineszenz gemessen werden, welche im Verhältnis zu der in den *pre-miR-NC1* transfizierten Zellen gesetzt wurde, wobei die Durchschnittswerte der *pre-miR-NC1*-transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt wurden (Abb. 14).

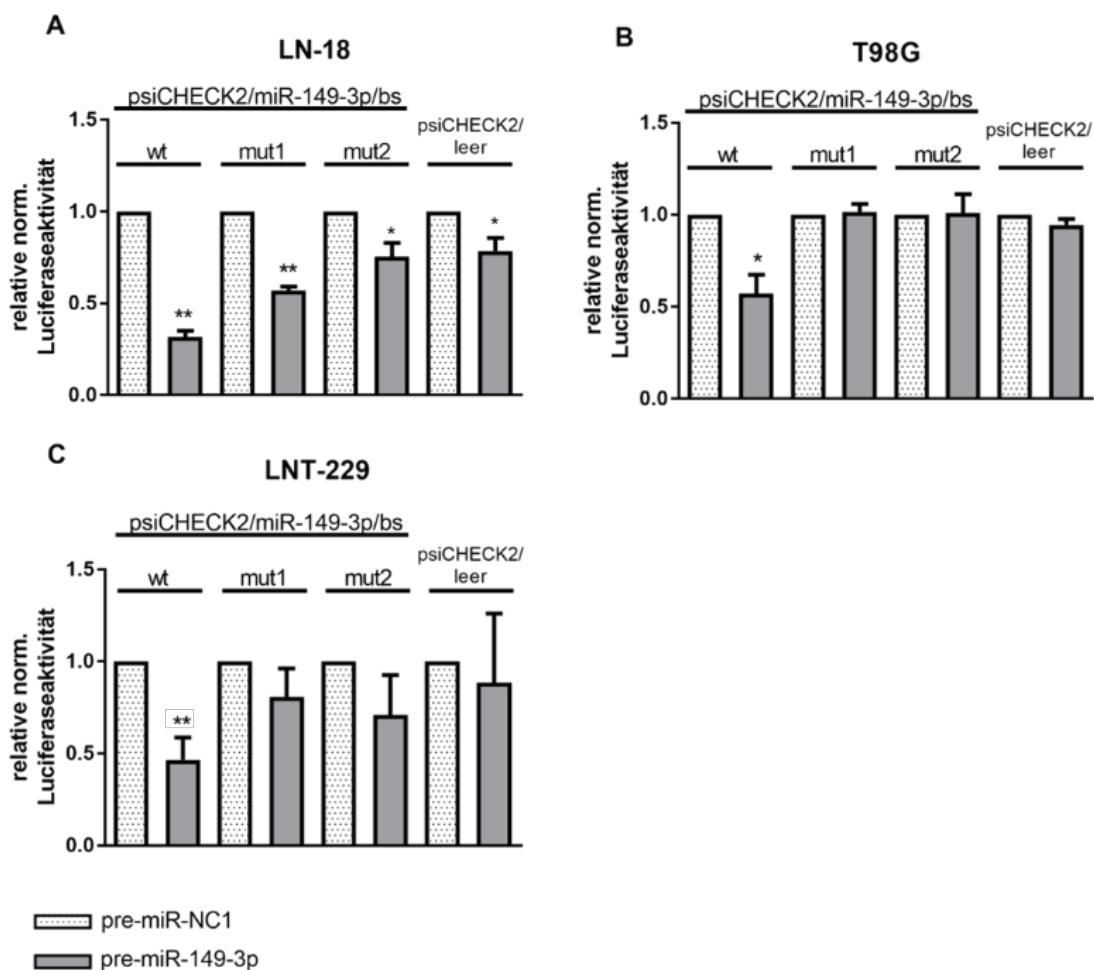


Abb. 14: *hsa-miR-149-3p* bindet direkt an die 3'-UTR vom *MGMT* Promotor in Glioblastomzelllinien.

Hier abgebildet ist die semiquantitative Auswertung des 3'-UTR-Luciferase-Reportergen-Assays. Es wurde eine transiente Transfektion der Zelllinien (A) LN-18, (B) T98G und (C) LNT-229 mit 50 nM *pre-miR-149-3p* (graue Balken) und 200 ng vom psiCHECKTM-2 Vektor-Konstruktes (wt: psiCHECK2/miR-149-3p/bs-wt; mut1: psiCHECK2/miR-149-3p/bs-mut1; mut2: psiCHECK2/miR-149-3p/bs-mut2; psiCHECK2/leer: Leervektor ohne Insert) durchgeführt. Die photometrisch gemessene *Renilla* Luciferase-Aktivität wurde normalisiert auf die Aktivität der *firefly* Luciferase und in Relation zu den kontrolltransfizierten Zellen gesetzt (*pre-miR-NC1*, gepunktete Balken), wobei die Durchschnittswerte der *pre-miR-NC1*-transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt wurden. Der Balken stellt den jeweiligen Mittelwert aus drei biologischen Replikaten dar, die vertikale Linie repräsentiert die jeweilige Standardabweichung. Der gepaarte einseitige t-Test ($n = 3$, $p < 0,05$) zeigte für mit *pre-miR-149-3p* und psiCHECK2/miR-149-3p/bs-wt transfizierte Zellen in allen drei Zelllinien eine Reduzierung der Luciferase-Aktivität. (norm.: normalisiert, *: p-Wert $< 0,05$, **: p-Wert $< 0,01$)

In den drei mit psiCHECK2/miR-149-3p/bs-wt und *pre-miR-149-3p* kotransfizierten Glioblastomzelllinien LN-18, T98G, LNT-229 konnte eine Reduzierung der Luciferase-Reportergen-Aktivität gemessen werden. Bei LN-18 verringerte sich die Luciferase-Aktivität um $0,69 \pm 0,06$, bei T98G um $0,43 \pm 0,18$ und bei LNT-229 um $0,53 \pm 0,12$ im Vergleich zur Luciferase-Aktivität in den kontrolltransfizierten Zellen. Bei T98G und LNT-229 mit *hsa-miR-149-3p* und psiCHECK2/miR-149-3p/bs-mut1 oder

psiCHECK2/miR-149-3p/bs-mut2 kotransfizierten Zellen ließ sich kein signifikanter Unterschied zu den pre-miR-NC1 transfizierten Zellen nachweisen. In den LN-18 Zellen, die mit pre-miR-149-3p und psiCHECK2/miR-149-3p/bs-mut1 transfiziert wurden zeigte sich eine Luciferase-Aktivitätsreduzierung um $0,43 \pm 0,03$, bei psiCHECK2/miR-149-3p/bs-mut2 um $0,25 \pm 0,13$. Somit lag trotz fehlender Bindungsstelle der *hsa-miR-149-3p* im Vektor-Insert-Konstrukt eine Luciferase-Aktivitätsreduzierung vor. Aus diesem Grund erfolgte ergänzend eine Kotransfektion der Glioblastomzelllinien mit dem Vektor ohne Insert und der *pre-miR-149-3p*. Es wäre zu erwarten, dass sich die Luciferase-Aktivität zwischen den kontrolltransfizierten und den psiCHECK2/leer und *pre-miR-149-3p* kotransfizierten Glioblastomzelllinien ähnelt. In den mit psiCHECK2/leer und pre-miR-149-3p kotransfizierten T98G und LNT-229 Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu den *pre-miR-NC1* transfizierten Zellen, bei LN-18 Zellen lag eine Reduzierung des Luciferase Signals um $0,22 \pm 0,12$ vor. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass *hsa-miR-149-3p* direkt an die 3'-UTR von *MGMT* bindet.

3.6 Untersuchung der TMZ-Sensitivität in *hsa-miR-149-3p* überexprimierenden Glioblastomzelllinien

Um herauszufinden, ob die Überexpression der *hsa-miR-149-3p* in Glioblastomzellen deren TMZ-Sensitivität beeinflusst, wurden T98G und LN-18 Glioblastomzelllinien mit *pre-miR-149-3p* und der Kontrolle *pre-miR-NC1* transient transfiziert. Es folgte eine TMZ-Behandlung über eine Gesamtdauer von 192 h mit Konzentrationen bis zu 2000 μM . Anschließend wurde die Zellvitalität mit einem Zellvitalität-Assay gemessen. Es lagen je fünf technische Replikate pro Konzentration vor, jeweils für die *pre-miR-149-3p* und die kontrolltransfizierten Zellen. Die gemessene Lumineszenz der fünf technischen Replikate wurden jeweils gemittelt und in einer logarithmischen Skala in Abb. 15 dargestellt. Anschließend erfolgte die rechnerische Bestimmung des IC50-Wertes unter Verwendung des negativen dekadischen Logarithmus der mittleren inhibitorischen Konzentration der *pre-miR-149-3p* und kontrolltransfizierten Zellen. Ein sechstes technisches Replikat diente der Bestimmung der Transfektionseffektivität. Alle zur Untersuchung der TMZ-Sensitivität verwendeten Transfektionsansätze zeigten ein erhöhtes *hsa-miR-149-3p* Expressionsniveau oder eine verminderte *MGMT* Expression

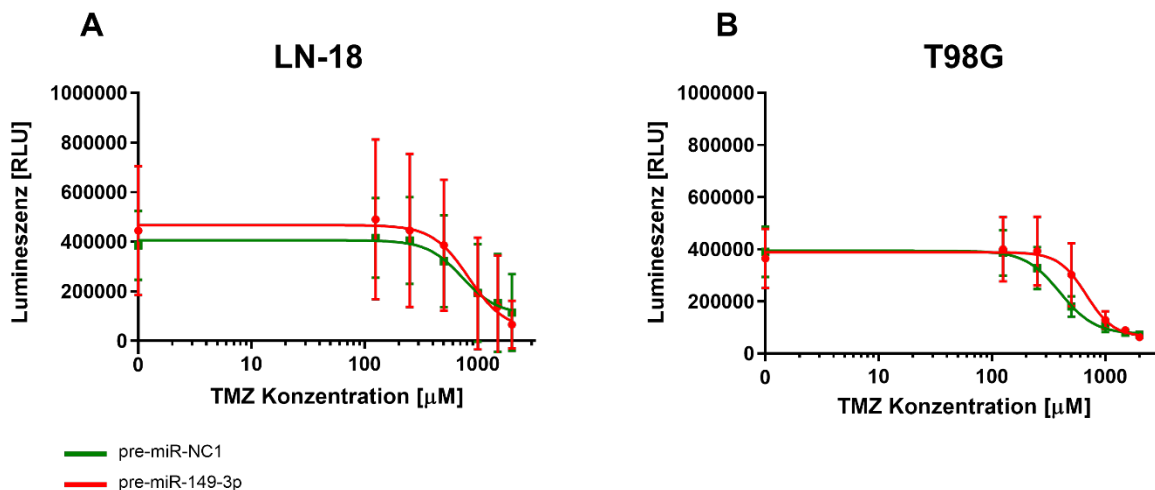


Abb. 15: Zellvitalität von Glioblastomzellen nach Transfektion mit *pre-miR-149-3p* und TMZ-Behandlung.

LN-18 (A) und T98G (B) wurden transient mit 25 nM synthetischen pre-miRNAs (*pre-miR-149-3p* in Rot, *pre-miR-NC1* in Grün dargestellt) ($n = 3$) transfiziert. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von bis zu 2000 μM Temozolomid (TMZ) in jeweils fünf Replikaten behandelt, die gemittelt wurden. Eine Zellvitalitätsmessung erfolgte nach einer gesamt TMZ-Expositionsdauer von 192 h. Der gepaarte zweiseitige t-Test ($n = 3$, $p < 0,05$) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen dem IC50-Wert der transfizierten verglichen mit den kontrolltransfizierten Glioblastomzellen. Aufgrund der zu großen Abweichung zwischen den drei biologischen Replikaten konnte keine Aussage über den Einfluss der *hsa-miR-149-3p* getroffen werden. (RLU: *relative light units*)

Der IC50-Wert der *pre-miR-149-3p* transfizierten Zellen unterschied sich bei starker Abweichung zwischen den drei biologischen Replikaten nicht signifikant von dem IC50-Wert der kontrolltransfizierten Zellen. Dies galt in beiden Zelllinien, bei LN-18 wurde die Hypothese bei einem p-Wert von 0,68 verworfen, bei T98G bei einem p-Wert von 0,19. Wegen der starken Abweichung zwischen den drei biologischen Replikaten erfolgte eine zusätzliche automatisierte Variante der TMZ-Exposition, bei der die TMZ-Applikation maschinell erfolgte (siehe hierzu 3.7).

3.7 Bestimmung der TMZ-Sensitivität in *pre-miR-149-3p* transfizierten Glioblastomzelllinien mit Hilfe TMZ-beschichteter Zellkulturplatten

Als ergänzende Methode, um herauszufinden, ob die Überexpression der *hsa-miR-149-3p* in Glioblastomzellen die TMZ-Sensitivität beeinflusst, erfolgte eine TMZ-Behandlung mittels TMZ-beschichteter Zellkulturplatten. Hierzu erfolgte zunächst eine transiente Transfektion der T98G und LN-18 Zellen mit jeweils der *pre-miR-149-3p* und der Kontrolle *pre-miR-NC1*. Anschließend wurden die transfizierten Zellen in mit TMZ-beschichtete Platten ausgesät, wobei Konzentrationen von 50 μM bis 750 μM TMZ vorlagen. Nach 72 h wurde die Zellvitalität mit dem *CellTiter-Glo® Luminescent Kit* von Promega gemessen. Es

lagen jeweils 3 technische Replikate pro Konzentration vor. Die gemessenen Lumineszenzen der Replikate wurden gemittelt (Abb. 16) dargestellt. Anschließend erfolgte die rechnerische Bestimmung des IC₅₀-Wertes unter Verwendung des negativen dekadischen Logarithmus der mittleren inhibitorischen Konzentration von den *pre-miR-149-3p* und den kontrolltransfizierten Zellen. Ein 4. technisches Replikat diente der Bestimmung der Transfektionseffektivität. Alle zur Untersuchung der TMZ-Sensitivität verwendeten Transfektionsansätze zeigten ein erhöhtes *hsa-miR-149-3p* Expressionsniveau.

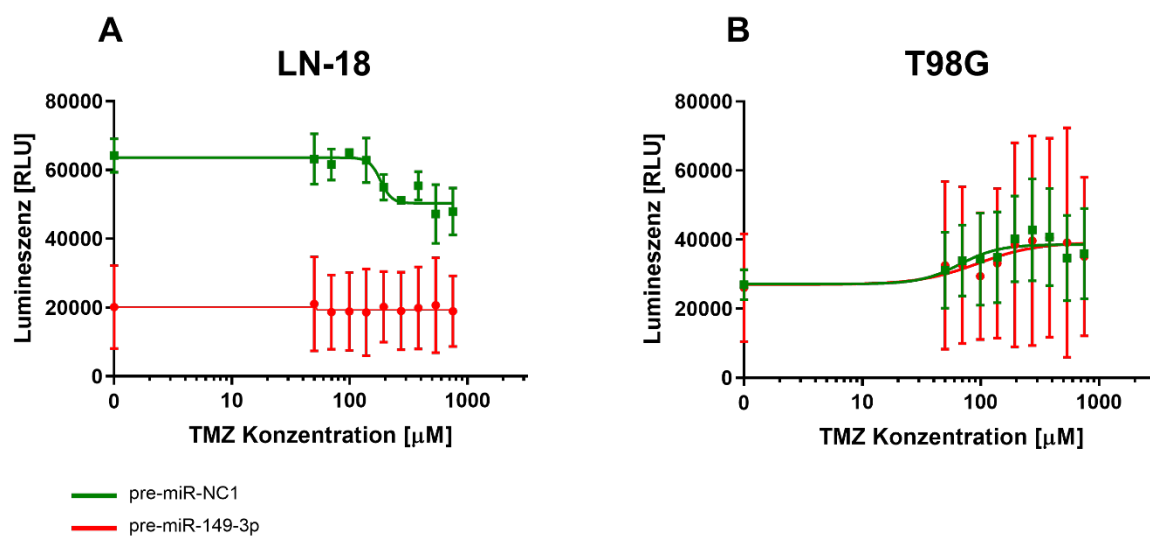


Abb. 16: Zellvitalität von Glioblastomzellen nach Transfektion von *pre-miR-149-3p* und TMZ-Behandlung mit Hilfe eines automatisierten Verfahrens.

LN-18 (A) und T98G (B) wurden transient mit synthetischen pre-miRNAs (*pre-miR-149-3p* in Rot, *pre-miR-NC-1* in Grün dargestellt) in einer Konzentration von 25 nM transfiziert (n = 3). Die Zellen wurden mit Konzentrationen von 50 µM bis 750 µM Temozolomid (TMZ) in jeweils 3 Replikaten behandelt. Die Messwerte der Replikate wurden gemittelt. Die Zellvitalitätsmessung erfolgte nach einer gesamten TMZ-Expositionsdauer von 72 h. Eine Beeinflussung des IC₅₀-Wertes von TMZ durch Transfektion der pre-miRNA konnte nicht nachgewiesen werden. (RLU: *relative light units*)

In der Zelllinie LN-18 zeigte sich graphisch eine konzentrationsunabhängige Erniedrigung der Zellvitalität in den *pre-miR-149-3p* transfizierten Glioblastomzellen. Bei LN-18 lag der IC₅₀-Wert bei den kontrolltransfizierten Glioblastomzellen bei 182,4 µM, bei den *pre-miR-149-3p* transfizierten Zellen zeigte sich allerdings durch den konzentrationsunabhängigen Effekt der miRNA Überexpression kein sigmoidaler Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve, sodass keine valide Bestimmung eines IC₅₀-Wertes möglich war. Aufgrund der starken Abweichung zwischen den drei biologischen Replikaten konnte keine Aussage über den Einfluss der *hsa-miR-149-3p* auf die TMZ Sensibilität in der Zelllinie T98G getroffen werden.

3.8 Funktionale Effekte einer *hsa-miR-149-3p* Überexpression in humanen Glioblastomzelllinien

Zur Bestimmung der Apoptoserate, der Proliferation und der Vitalität nach Überexpression von *hsa-miR-149-3p* in Glioblastomzellen wurden T98G, LN-18 und A172 mit *pre-miR-149-3p* transient transfiziert. Die Zelllinie A172 ist eine Glioblastomzelllinie mit einem methylierten *MGMT* Promotor, somit würde ein miRNA Effekt in der A172 Zelllinie *MGMT*-unabhängig sein [126]. Anschließend wurde die Aktivität der Caspasen 3/7 bestimmt (siehe 2.2.13), die Proliferationsrate mit Hilfe des BrdU-basierenden Chemilumineszenz-Nachweisverfahrens untersucht (siehe 2.2.12) und ein Zellvitalitäts-Assay durchgeführt (siehe 2.2.14). Die pro Assay und pro Glioblastomzelllinie gemessene Lumineszenz der mit *pre-miR-149-3p* transfizierten Zellen wurde in Relation zur Lumineszenz in den *pre-miR-NC1* transfizierten Kontrollzellen gesetzt, wobei die Durchschnittswerte der *pre-miR-NC1*-transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt wurden (Abb. 17).

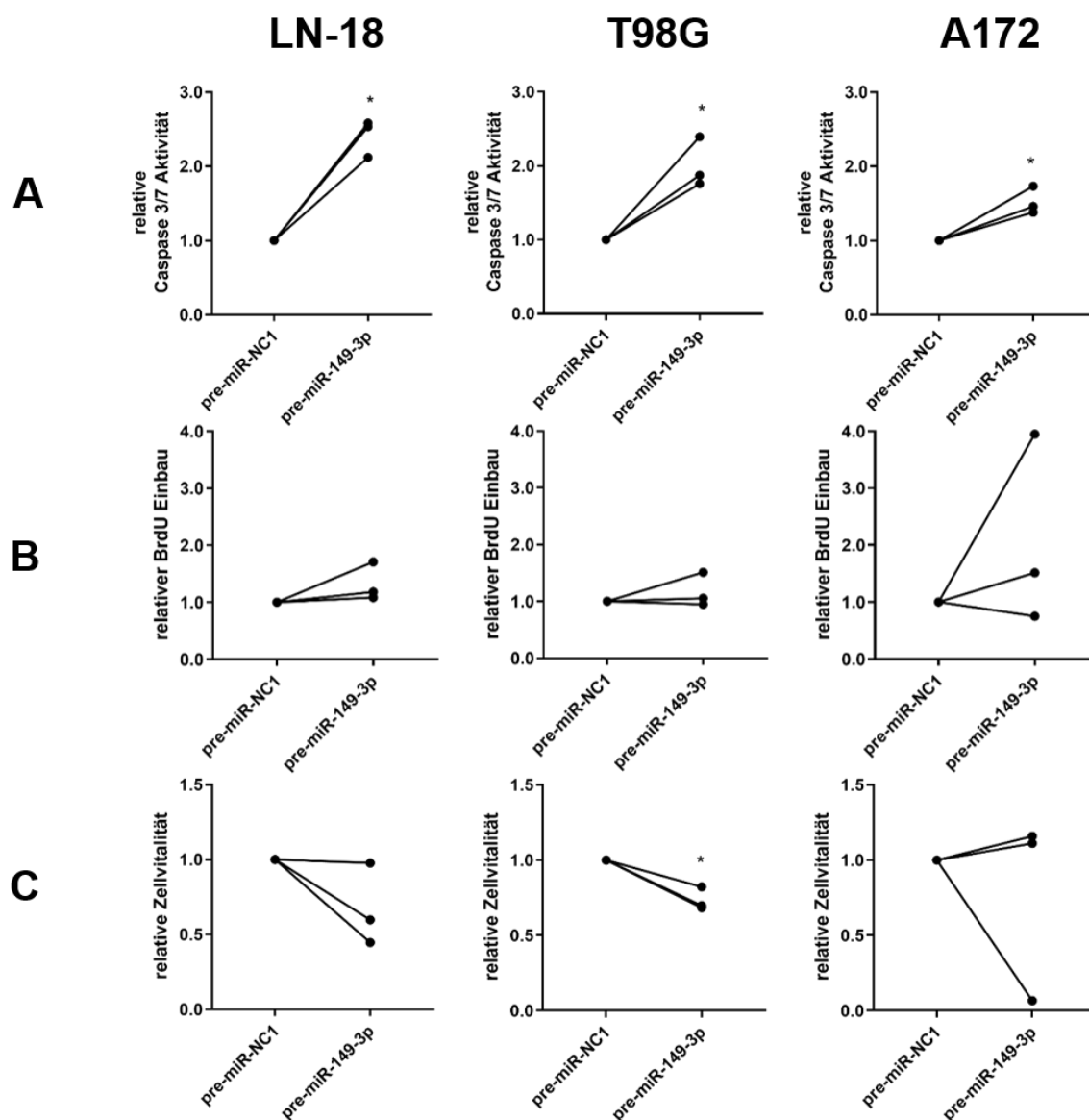


Abb. 17: Caspase 3/7 Aktivität, Zellproliferation und Zellvitalität in Glioblastomzelllinien nach Überexpression von *hsa-miR-149-3p*.

Dargestellt sind die funktionalen Effekte einer *hsa-miR-149-3p* Überexpression in den Glioblastomzelllinien LN-18, T98G und A172. Die drei verschiedenen Glioblastomzelllinien wurden jeweils mit 25 nM *pre-miR-149-3p* transient transfiziert. In (A) wurde die Apoptoserate mittels Messung der Caspase 3/7 Aktivität bestimmt. Bei (B) wurde das *Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent)* Kit verwendet und bei (C) wurde die Zellvitalität mit Hilfe des *CellTiter-Glo® Luminescent Assays* bestimmt. Die gemessenen Werte der jeweils drei biologischen Replikate wurde in Relation zur pre-miR-NC1 transfizierten Zellgruppe gesetzt, wobei die Durchschnittswerte der pre-miR-NC1-transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt wurden. Der gepaarte zweiseitige t-Test ($n = 3$, $p < 0,05$) zeigte in allen drei Glioblastomzelllinien eine Steigerung der Caspase 3/7 Aktivität. Ein signifikanter Unterschied in der Zellproliferation konnte nicht festgestellt werden. In der T98G Glioblastomzelllinie reduzierte die *hsa-miR-149-3p* Überexpression die Zellvitalität signifikant. (*: p -Wert $< 0,05$; BrdU: Bromdesoxyuridin)

In allen drei Glioblastomzelllinien ließ sich eine signifikante Steigerung der Apoptoserate nach Überexpression der *hsa-miR-149-3p* nachweisen. Hierbei war der Effekt bei den LN-18

Zellen am stärksten ausgeprägt, es lag hierbei eine Steigerung um $1,41 \pm 0,25$ der Apoptoseaktivität vor. Bei T98G war die Caspase 3/7 Aktivität im Vergleich zu den *pre-miR-NC1* transfizierten Zellen doppelt so hoch bei einer Steigerung um $1,01 \pm 0,34$, bei A172 betrug sie das 1,5-fache mit einer Steigerung um $0,53 \pm 0,19$.

In den drei untersuchten Glioblastomzelllinien LN-18, T98G und A172 ließ sich keine signifikante Veränderung der Zellproliferation nach transienter Überexpression von *hsa-miR-149-3p* feststellen.

In der Glioblastomzelllinie T98G ließ sich eine signifikante Reduzierung der Zellvitalität um $0,27 \pm 0,08$ erkennen. Bei den anderen zwei verwendeten Glioblastomzelllinien LN-18 und A172 unterschied sich die Zellvitalität in den *pre-miR-149-3p* transfizierten Zellen nicht signifikant von denen der Kontrolle.

4 Diskussion

4.1 MGMT regulierende miRNAs in Glioblastomen

Das Glioblastom ist der bösartigste primäre Hirntumor im Erwachsenenalter, mitbedingt durch das infiltrative Wachstum und eine intrinsische oder erworbene Therapieresistenz [1, 2]. Trotz aggressiver multimodaler Therapie mit operativer Tumorresektion, Chemotherapie und Strahlentherapie überleben die Patienten im Median lediglich 14-16 Monate [26]. Der nach aktuellem Wissensstand wichtigste prognostische und prädiktive Biomarker für Glioblastompatienten ist der Promotormethylierungsstatus des Gens für das DNA-Reparaturprotein MGMT, da dieser das Therapieansprechen des verwendeten alkylierenden Chemotherapeutikums TMZ beeinflusst. Hierbei gilt: eine Methylierung des *MGMT* Promotors bedingt ein niedriges MGMT Expressionslevel, was ein besseres TMZ-Therapieansprechen verursacht *et vice versa* [13, 26, 54-56]. Abgesehen vom *MGMT*-Promotormethylierungsstatus gibt es allerdings weitere Einflussfaktoren der MGMT Expression, welche potenziell einen Einfluss auf das Ansprechen auf die Glioblastomtherapie haben könnten, hierunter auch miRNAs. Im Rahmen dieser Arbeit galt es herauszufinden, ob bestimmte miRNAs zu einer verminderten MGMT-Expression in einem Teil der Glioblastome ohne *MGMT*-Promotormethylierung beitragen können.

Zum jetzigen Wissensstand gibt es neun miRNAs, über die ein *in vitro* nachgewiesener Effekt auf die MGMT Expression in Glioblastomzellen publiziert wurde. Die Tabelle 21 bietet hierzu eine Übersicht. Durch die jeweilige Überexpression der miRNAs *hsa-miR-221/222*, *hsa-miR-603* und *hsa-miR-767-3p* konnte eine *MGMT* mRNA Expressionsminderung in Glioblastomzellen erreicht werden [120, 121, 124]. Bei den mit pre-miRNAs der miRNAs *hsa-miR-142-3p* oder *hsa-miR-648* transfizierten Glioblastomzellen zeigte sich jeweils auf Proteinebene eine verminderte MGMT Expression, während es bei den miRNAs *hsa-miR-181d*, *hsa-miR-198* und *hsa-miR-370-3p* eine MGMT Expressionshemmung auf Transkript- und Proteinebene war [120, 121, 129-132]. Eine interessante Beobachtung machten dabei Kushwaha *et al.* im Jahr 2014 [121]. Sie konnten nicht nur den inhibierenden Effekt der miRNAs *hsa-miR-603* und *hsa-miR-181d* auf die *MGMT* Expression nachweisen, sondern beobachteten einen verstärkten Effekt bei gleichzeitiger Transfektion von beiden miRNAs. Dieser Effekt ließ sich dadurch erklären, dass die zwei miRNAs an zwei verschiedenen Stellen der 3'-UTR von *MGMT* binden,

sodass insgesamt eine quantitativ noch stärker reduzierte *MGMT* Translation stattfindet [121].

Tabelle 21: Übersichtstabelle aller bekannten miRNAs, die die *MGMT* Expression *in vitro* regulieren.

Name der miRNA	Wirkmechanismus	Referenz
<i>hsa-miR-142-3p</i>	Hemmung der <i>MGMT</i> Protein Translation	[129]
<i>hsa-miR-181d</i>	Degradation der <i>MGMT</i> mRNA Hemmung der <i>MGMT</i> Protein Translation	[120, 121, 130]
<i>hsa-miR-198</i>	Degradation der <i>MGMT</i> mRNA Hemmung der <i>MGMT</i> Protein Translation	[131]
<i>hsa-miR-221</i>	Degradation der <i>MGMT</i> mRNA	[124]
<i>hsa-miR-222</i>	Degradation der <i>MGMT</i> mRNA	[124]
<i>hsa-miR-370-3p</i>	Degradation der <i>MGMT</i> mRNA Hemmung der <i>MGMT</i> Protein Translation	[132]
<i>hsa-miR-603</i>	Degradation der <i>MGMT</i> mRNA	[121]
<i>hsa-miR-648</i>	Hemmung der <i>MGMT</i> Protein Translation	[120]
<i>hsa-miR-767-3p</i>	Degradation der <i>MGMT</i> mRNA	[120]

In der hier vorliegenden Arbeit konnte mit *hsa-miR-149-3p* eine weitere, bisher nicht beschriebene *MGMT* regulierende miRNA identifiziert und *in vitro* näher charakterisiert werden. Sowohl auf Transkript als auch auf Proteinebene ließ sich durch *hsa-miR-149-3p* Überexpression eine Reduzierung des *MGMT* Expressionslevels in zwei verschiedenen Glioblastomzelllinien nachweisen.

4.2 Fallstricke der transienten miRNA Überexpression

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Erfolg der transienten Transfektion der Glioblastomzelllinien mit miRNAs per RT-qPCR kontrolliert. Hierbei zeigte sich in den mit den pre-miRNAs der miRNAs *hsa-miR-345-5p*, *hsa-miR-491-5p*, *hsa-miR-324-3p* oder *hsa-miR-93-3p* transfizierten Zelllinien weder der zu erwartende Effekt auf die *MGMT* mRNA noch auf die *MGMT* Proteinexpression. Hierbei wäre zu erwarten gewesen, dass eine miRNA, die die voraussetzenden Kriterien erfüllt (1) eine Bindungsstelle in der 3'-UTR von *MGMT* zu haben, (2) ein hohes Expressionsniveau in Glioblastomen aufweist und (3) eine inverse Korrelation zur *MGMT* mRNA Expression hat, die *MGMT* Expression *in vitro*

inhibiert. Das MGMT Expressionslevel in den transfizierten Glioblastomzelllinien unterschied sich jedoch nicht signifikant von dem der kontrolltransfizierten Glioblastomzelllinien. Eine Ausnahme bilden hierbei die *hsa-miR-149-3p* transfizierten Zellen. Eine Diskrepanz zwischen dem in der RT-qPCR nachweisbaren miRNA Expressionsniveau zur Quantität der biologisch aktiven miRNAs im Rahmen vom RISC Komplex könnte hierbei die Ursache für die fehlende MGMT Suppression sein. Thomson *et al.* schildert im Jahr 2013 die hier zu Grunde liegende Thematik [133]. Man findet nach transienter Transfektion mit miRNAs zwar unphysiologisch hohe miRNA Expressionslevel, allerdings liegen diese nur zum sehr viel kleineren Anteil an dem Protein Ago2 gebunden vor. Da allerdings nur die miRNAs, die an das Protein Ago2 im Rahmen des RISC Komplexes gebunden vorliegende Transkripte regulieren können, unterscheidet sich das hohe miRNA Niveau von dem miRNA Niveau, das Transkripte regulieren kann. Somit täuscht das hohe Expressionslevel der miRNAs einen zu erwartenden Effekt auf die MGMT Expression vor. Thomson *et al.* empfehlen hierbei sich eher auf die funktionellen Effekte der miRNAs zu konzentrieren, statt auf die quantitative Wertigkeit zu achten [133, 134]. Da sich in unseren Experimenten die MGMT inhibierende Wirkung durch Überexpression der miRNAs nicht nachweisen ließ, wäre somit fraglich, ob nicht höhere Konzentrationen der miRNAs notwendig gewesen wären, um über mehr biologisch aktive miRNAs zu verfügen. In anderen Publikationen wurden höhere Konzentrationen verwendet, um eine miRNA bedingte Protein-Expressionshemmung zu erzielen, beispielsweise bei Lin *et al.* im Jahr 2010 und Quintavalle *et al.* im Jahr 2013 wo 100 nM der miRNA Vorläufer zum Einsatz kamen [124, 135]. Gegen den Einsatz höherer miRNA Konzentrationen zur transienten Transfektion der Zelllinie spricht, dass eventuell die Sättigung des aktiven miRNA-Systems bereits erreicht wurde und sich deswegen kein Effekt durch höhere miRNA Konzentrationen erreichen lässt [136]. Die quantitative Menge an Ago-Protein als potenziell limitierenden Faktor könnte man ergänzend bestimmen, um besser die Menge an biologisch aktiver miRNAs einzuschätzen [134]. Zusätzlich wiesen Jin *et al.* im Jahr 2015 nach, dass durch die transiente Transfektion von miRNAs in den in der experimentellen Forschung gebräuchlichen, unphysiologischen hohen Konzentrationen, eine Menge mutierter miRNAs ebenfalls in den Zellen entstehen [136]. Diese mutierten miRNAs weichen von der ursprünglich transfizierten miRNA um beispielsweise ein Nukleotid ab und stehen im Verdacht unspezifische Effekte abseits der eigentlichen Zielgene zu verursachen. Es zeigte sich zusätzlich, dass bei Transfektion geringerer miRNA Konzentrationen die Regulierung

der Zielgene ausblieb [136]. Diese Publikationen bietet einen Erklärungsansatz, warum die Überexpression von miRNAs Limitationen hat.

Insgesamt wäre es hilfreich abzugrenzen, wie viel der Proteine des RISC Komplexes (TRBP und Ago2) ungebunden vorliegen, da an diese eine miRNA potenziell binden könnte, um den RISC Komplex zu bilden. Hiermit könnte man versuchen abzugrenzen, ob durch die miRNA Transfektion ein weit höheres Expressionslevel an miRNA im Rahmen vom RISC Komplex überhaupt erreicht werden kann.

Die bisherigen Erklärungsansätze gehen von der Hypothese aus, dass die fehlende miRNA-bedingte *MGMT* Regulierung einer mangelnden Transfektionseffizienz der miRNAs geschuldet ist. Sehr plausibel scheint aber auch die Erklärung zu sein, dass die miRNAs *hsa-miR-345-5p*, *hsa-miR-491-5p*, *hsa-miR-324-3p* oder *hsa-miR-93-3p* nicht tatsächlich an die 3'-UTR von *MGMT* binden. Potenzielle Bindungsstellen dieser vier miRNAs in der 3'-UTR von *MGMT* wurden im Rahmen der Vorarbeiten mittels miRWalk vorhergesagt. Der Vorteil dieser Datenbank besteht darin, dass miRWalk sich den Ergebnissen mehrerer verschiedener Datenbanken bedient, um eine umfassendere Beurteilung der miRNA-mRNA Kompatibilität angeben zu können. Auch bereits validierte *in vitro*-Analysen werden bei miRWalk miteingeschlossen [118, 119]. Zum Abgleich einer miRNA-mRNA Interaktion gehört nicht nur die Kompatibilität der 3'-UTR der mRNA zur *seed region* der miRNA, denn diese alleine reicht bei weitem nicht aus, um eine Interaktion vorherzusagen [137]. Auch die Zugänglichkeit der potenziellen miRNA-Bindungsstellen ist relevant. Wenn sich beispielweise Sekundärstrukturen der mRNA gebildet haben, könnte der RISC Komplex nur noch schwer an die miRNA-Bindungsstelle gelangen [138]. Dennoch ist es einem bioinformatischen Programm heutzutage noch nicht möglich, alle relevanten biologischen Faktoren für die miRNA-mRNA Interaktion mit abzubilden. Hierzu gehört beispielsweise die Variabilität der Länge der 3'-UTR, welche jeweils abhängig ist vom Ausmaß der Polyadenylierung. Hierdurch kann es zu unterschiedlich langen Isoformen von Transkripten kommen, welche die Anzahl der miRNA-Bindungsstellen beeinflusst [139, 140]. Kreth *et al.* zeigten, dass unterschiedlich lange *MGMT* Transkripte in Glioblastomzellen eine unterschiedliche miRNA Bindung ermöglichen [120]. So kommt es in der Summe häufig zu falsch-positiven Interaktionsvorhersagen zwischen miRNA und mRNA. Aus diesem Grund ist eine Diskrepanz zwischen *in silico* Analysen und *in vitro* Versuchsergebnissen nicht unerwartet.

Fan *et al.* und Thomson *et al.* thematisieren eine weitere Möglichkeit, den Effekt einer miRNA in einer Zelllinie zu untersuchen [133, 141]. Das Vorgehen ist hierbei eine Zelllinie mit den jeweiligen miRNA Inhibitoren zu transfizieren, als zusätzlichen Vergleich zur kontrolltransfizierten und zur transfizierten Zelllinie. Hierbei waren die Protein-expressionshemmenden Effekte deutlich stärker ersichtlich, da man zusätzlich zur kontrolltransfizierten Zelllinie den Vergleich mit der miRNA-Inhibitor-transfizierten Zelllinie hatte [133, 141].

4.3 Die miRNA *hsa-miR-149-3p* bindet direkt an die 3'-UTR von *MGMT* und möglicherweise an eine ektope Stelle im psiCHECK™-2 Vektor

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die miRNA *hsa-miR-149-3p* direkt an die 3'-UTR des *MGMT* Promotors bindet. Dabei zeigte der 3'-UTR-Luciferase-Reportergen-Assay in den Zelllinien LN-18 und T98G überraschenderweise unterschiedliche Ergebnisse. In den T98G Zellen konnte, wie erwartet, mit Hilfe des 3'-UTR-Luciferase-Reportergen-Assays eine erniedrigte Lumineszenz in den mit *pre-miR-149-3p* und einem Vektorkonstrukt mit der 3'-UTR Bindungsstelle kotransfizierten Zellen beobachtet werden. Dieser Effekt wurde durch Mutation der miRNA-Bindungsstelle in der 3'-UTR von *MGMT* aufgehoben. Dagegen zeigte die Glioblastomzelllinie LN-18 auch bei gleichzeitiger Transfektion der *pre-miR-149-3p* und des psiCHECK™-2 Vektorkonstrukts mit mutierter 3'-UTR-Bindungsstelle ein erniedrigtes Lumineszenzsignal im Vergleich zur Kontrolltransfektion. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt liefert eine zur *hsa-miR-149-3p* komplementäre Sequenz von 14 nt in der für die *firefly* Luciferase kodierenden Vektorsequenz. Es wäre daher möglich, dass durch die Transfektion der *pre-miR-149-3p* auch das Signal der internen Transfektionskontrolle, nämlich der *firefly* Luciferase, supprimiert wird. Diese Vermutung bestätigt sich dadurch, dass selbst bei Kotransfektion der *pre-miR-149-3p* und eines leeren psiCHECK™-2 Vektors eine im Vergleich zur *pre-miR-NC1* Transfektion erniedrigte Lumineszenz messbar ist. Wegen dieses unerwarteten Ergebnisses in den LN-18 Zellen wurde das 3'-UTR-Luciferase-Reportergen-Assay in den Glioblastomzelllinien LNT-229 und A172, die beide kein *MGMT* exprimieren, wiederholt [126-128]. Der Grund für die zwei zusätzlichen Zelllinien war, dass wenn eine *MGMT* inhibierende miRNA in einer *MGMT* exprimierenden Zelllinie transfiziert wird, die miRNAs eventuell hauptsächlich an die *MGMT* mRNA und quantitativ weniger an die Bindungsstelle im

3'-UTR-Luciferase-Reportergen-Konstrukt binden. Hierbei zeigte sich in LNT-229 Zellen dasselbe Ergebnis wie in der Zelllinie T98G: die *hsa-miR-149-3p* bindet direkt und ausschließlich an die 3'-UTR von *MGMT*. In den A172 Zellen kam es allerdings durch die Kotransfektion des psiCHECK™-2 Vektors und der *pre-miR-149-3p* zu einem mikroskopisch und photometrisch beurteilten starkem Absterben der Zellen, sodass keine valide Aussage über die Auswertung des 3'-UTR-Luciferase-Reportergen-Assays möglich war. Insgesamt ist der Einfluss der miRNA-MGMT Interaktion auf den 3'-UTR-Luciferase-Reportergen-Assays unwahrscheinlich, da die Glioblastomzelllinie T98G eine höhere *MGMT* Expression als LN-18 hat und die transfizierten miRNA-Konzentrationen insgesamt unphysiologisch hoch sind [55, 124-126]. Der beobachtete Effekt in den LN-18 Zellen ist nicht schlüssig erklärbar.

Eine ähnlichen – wie den hier in LN-18 Zellen gezeigten – Effekt, nämlich eine erniedrigte Luciferase-Aktivität nach gleichzeitiger Transfektion von Zellen mit einer miRNA und einem Vektor, der die mutierte Bindungsstelle dieser miRNA enthält, wurde auch von Quintavalle *et al.* 2013 beschrieben [124]. Auch Lin *et al.* stellten 2010 eine Reduktion des Lumineszenzsignals auf 80 % durch die Kotransfektion einer miRNA und eines Vektors ohne Bindungsstelle für die untersuchte miRNA fest [135]. In den beiden hier erwähnten Publikationen wurde, wie in dieser Arbeit, ein Vektorkonstrukt der Firma Promega verwendet, allerdings jeweils ohne konstitutiv exprimierte interne Kontrolle in Form der *firefly* Luciferase (phRG-TK Plasmid, pRL-TK Plasmid). Somit würde hierbei die Bindungsstelle an der internen Kontrolle auch keine Begründung sein für eine erniedrigte Lumineszenz bei Kotransfektion einer miRNA und eines leeren psiCHECK™-2 Vektors.

Insgesamt ergibt sich die Erkenntnis, dass ein 3'-UTR-Luciferase-Reportergen-Assay in Abhängigkeit von der Zelllinie zu unterschiedlichen Resultaten führen kann. Es empfiehlt sich, im verwendeten Plasmid nach ektopen Bindungsstellen der verwendeten miRNA zu suchen. Fraglich bleibt dennoch, warum der Effekt durch die ektopre Bindung der *hsa-miR-149-3p* an den psiCHECK™-2 Vektor lediglich in einer von drei hier verwendeten Glioblastomzelllinien beobachtet wurde.

4.4 Die miRNA *hsa-miR-149-3p* hat keinen Einfluss auf die TMZ-Resistenz von Glioblastomzellen

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob durch die *MGMT* regulierende miRNA *hsa-miR-149-3p* eine TMZ-Sensibilisierung von Glioblastomzellen nach Überexpression

erreicht wird. Hierbei erfolgten zwei unterschiedliche Varianten der TMZ-Behandlung: (1) die tägliche Applikation von TMZ über einen Zeitraum von 192 h und (2) die Gabe von transfizierten Glioblastomzellen auf TMZ-vorbeschichteten Zellkulturplatten über eine Gesamtkubationsdauer von 72 h. Es zeigte sich wider Erwarten kein Dosis-abhängiger Effekt der TMZ-Behandlung von T98G und LN-18 Zellen nach Überexpression von *hsa-miR-149-3p*. Die Zellvitalität unterschied sich nicht signifikant zwischen den *pre-miR-149-3p* und kontrolltransfizierten T98G Zellen. LN-18 Zellen zeigten nach *pre-miR-149-3p* Transfektion eine erniedrigte Zellvitalität im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen, allerdings war dieser Effekt TMZ Dosis-unabhängig.

Eine mögliche Erklärung für die fehlende TMZ-Sensibilisierung der T98G Zellen durch die miRNA *hsa-miR-149-3p* könnte darin begründet sein, dass diese Zellen aufgrund eines unmethylierten Promotors MGMT überexprimieren und die Transfektion mit der MGMT-inhibierenden *hsa-miR-149-3p* alleine nicht ausreicht, um die Zellvitalität bei gleichzeitiger TMZ-Behandlung zu beeinflussen [24, 125]. Andere Arbeiten konnten keine IC50 für TMZ bei T98G Zellen ermitteln, da die Zellvitalität sich selbst bei einer Konzentration von bis zu 1000 μM TMZ nicht relevant reduzieren ließ [142]. Auch weitere Publikationen untermauerten, dass T98G eine TMZ resistente Zelllinie ist [111, 127, 143-145]. Die Hypothese, dass die Transfektion einer MGMT inhibierenden miRNA die TMZ-Resistenz beeinflusst, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Überexpression der *hsa-miR-149-3p* nicht ausreichend das Expressionslevel des MGMT Proteins reduziert, um eine TMZ-Sensibilisierung herbeizuführen. In dieser Arbeit konnte das MGMT mRNA und Protein-Expressionsniveau in den Glioblastomzelllinien durch die Überexpression der *hsa-miR-149-3p* auf ungefähr 60 % verglichen mit der kontrolltransfizierten Zellgruppe reduziert werden. Die Ergebnisse legen somit nahe, dass diese Reduktion nicht ausreicht, um einen Effekt auf die TMZ-Sensitivität zu erreichen.

Auch die Publikation von Medarov *et al.* (2020) bietet eine Erklärung für die fehlende Wirkung der einer MGMT-regulierenden miRNA Überexpression auf die Zellvitalität der T98G Zellen bei TMZ-Behandlung [146]. Medarov und Koautoren identifizierten eine MGMT inhibierende miRNA, welche in Kombination mit Eisenoxid-Nanopartikeln die Zellvitalität der Zelllinie T98G reduziert. Je höher die Transfektionskonzentration der miRNA war, desto niedriger war die Zellvitalität der Glioblastomzellen. Während die

TMZ-Behandlung ohne miRNA bis zu einer Konzentration von 600 μM keinen Effekt zeigte, kam es durch die Überexpression einer miRNA mit Eisenoxid-Nanopartikeln zu einer TMZ-Sensibilisierung. Die TMZ-Sensibilisierung erreichte jedoch ab einer Konzentration von 200 μM TMZ ein Plateau, sodass bei höheren TMZ-Dosen keine TMZ Dosis-abhängige Wirkung entsteht. Der Erklärungsansatz ist, dass die MGMT abhängige TMZ-Resistenz nur bis zu einem gewissen Ausmaß die chemotherapeutische Resistenz der Glioblastomzelllinie T98G beeinflusst und das Protein MGMT nicht isoliert für die TMZ Resistenz der T98G Zelllinie verantwortlich ist [146]. Hinzu kommt, dass neben MGMT weitere Mechanismen in Glioblastomzellen existieren, die eine TMZ-Resistenz beeinflussen können. Beispielsweise kann eine Mutation in einem der MMR Enzyme dazu führen, dass die durch TMZ entstandenen Fehlpaarungen nicht erkannt werden und es nicht zur Apoptose kommt [147].

Da die MGMT Expression in den eigenen Experimenten in *pre-miR-149-3p* transfizierten T98G Zellen nur um ca. 40 % reduziert werden konnte, wurde ein Versuchsdurchlauf mit Transfektion einer höheren pre-miRNA Konzentration durchgeführt. Allerdings zeigte sich bei Transfektion der T98G Zelllinie mit 50 nM der miRNA *pre-miR-149-3p* der stärkste MGMT inhibierende Effekt, sodass diese Konzentration zur Durchführung der TMZ Experimente verwendet wurde. Roos *et al.* berichteten, dass die TMZ-Exposition von Glioblastomzellen eine Apoptosereaktion induziert, welche sehr langsam abläuft [148]. Aus diesem Grund sei es nötig, Glioblastomzellen über einen Zeitraum von mindestens 96 h TMZ auszusetzen, um die gewünschte Zelltoxizität zu erreichen [148]. Andere Autoren verfolgten ebenfalls den Ansatz einer längeren TMZ-Exposition und evaluierten erst nach 7 und 14 Tagen den Effekt einer TMZ-Exposition [121, 144]. Dies würde zumindest veranschaulichen, warum die TMZ-Exposition mit Hilfe vorbeschichteter TMZ-Platten nicht den zu erwartenden Effekt in der T98G Glioblastomzelllinie hervorrief, da hierbei die Expositionsdauer nur 72 h betrug.

Die Zelllinie LN-18 zeigte eine TMZ Dosis-unabhängige Reduktion der Zellvitalität. Auch in der Zelllinie LN-18 liegt ein unmethylierter *MGMT* Promotor vor und die Zelllinie exprimiert MGMT, sodass eine TMZ-Resistenz bekannt ist [111, 126, 127, 129]. Dem Kapitel 4.6 kann man entnehmen, welche weiteren regulatorischen Ziele der *hsa-miR-149-3p* in anderen Tumoren bereits entdeckt wurden. Es ist somit nicht

auszuschließen, dass der TMZ Dosis-unabhängige Effekt auf die Zellvitalität über ein anderes Zielgen als MGMT vermittelt wird.

Im Gegensatz zu den hohen TMZ Dosen von bis zu 2000 μM in der eigenen Arbeit haben die Autoren Gao *et al.* (2016) gezeigt, wie sie in den Zelllinien LN-18 und T98G bereits ohne die Transfektion mit einer MGMT regulierenden miRNA durch die Behandlung von bis zu 30 μM TMZ eine mäßige Reduktion der Zellvitalität erreichen konnte [132]. Hierbei wurden doppelt so hohe miRNA-Konzentrationen mit 50 nM verwendet [132]. Dieses deutliche TMZ-Ansprechen selbst ohne MGMT regulierende miRNA ist etwas konträr zu vielen anderen Arbeiten, welche darlegten, dass T98G und LN-18 eine TMZ-Resistenz aufweisen und teilweise ebenfalls sehr hohe TMZ-Konzentrationen notwendig waren [111, 126, 127, 129, 142-145]. Darunter beispielsweise Alonso *et al.*, welche einen IC50-Wert von 1585 μM TMZ bei der Glioblastomzelllinie T98G bestimmten [144].

Zusätzlich sollte man bedenken, dass die grundlegende Hypothese im Rahmen meines TMZ-Experiments ist, dass eine miRNA, die die MGMT Expression reduziert, die Glioblastomzellen zur TMZ Therapie sensibilisiert und demzufolge von prädictivem Vorteil für Glioblastompatienten wäre. Somit folgt man hierbei dem Ansatz, dass eine verminderte MGMT Expression durch Hypermethylierung des *MGMT* Promotors sich auf die Glioblastomzellen ähnlich auswirkt wie die Hemmung der MGMT Expression per miRNA-Überexpression. Allerdings ist die Datenlage hierzu bisher sehr ambivalent. Während manche Publikationen bestätigen konnten, dass die MGMT Expression per se einen prognostischen und prädictiven Marker darstellt, konnte in anderen Arbeiten kein derartiger Zusammenhang festgestellt werden [4, 58, 66, 67, 149]. Somit bleibt fraglich, ob durch die Überexpression einer MGMT-regulierenden miRNA eine TMZ-Sensitivierung erreicht werden kann. Da allerdings auch andere Arbeiten einen solchen Zusammenhang nachweisen konnte, scheint der grundsätzliche Gedanke dennoch schlüssig zu sein [121, 124, 127, 129-131]. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in den eigenen Untersuchungen in den Zelllinien T98G und LN-18 durch die Überexpression der *hsa-miR-149-3p* keine TMZ Sensibilisierung erreicht werden konnte.

4.5 *Hsa-miR-149-3p* fördert die Apoptoserate in Glioblastomzelllinien

Die Auswertung der in dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Assays ergab, dass die Überexpression der *hsa-miR-149-3p* zu einer Erhöhung der Apoptoserate in drei verschiedenen Glioblastomzelllinien führt. Ein Effekt der *hsa-miR-149-3p* Überexpression

auf die Zellproliferation von Glioblastomzellen konnte wiederum nicht nachgewiesen werden. Ebenfalls zeigte sich lediglich in einer Zelllinie eine signifikante Reduktion der Zellvitalität durch die Überexpression der *hsa-miR-149-3p*. Die Reduktion der Zellvitalität ist hierbei vermutlich auf die pro-apoptotische Wirkung der *hsa-miR-149-3p* zurückzuführen. In den beiden anderen Zelllinien waren die Ergebnisse der einzelnen Experimente zur Bestimmung der Zellvitalität nach *hsa-miR-149-3p* Überexpression zu unterschiedlich, so dass sich kein signifikantes Ergebnis zeigte.

Wenn man den Zusammenhang von *hsa-miR-149-3p* und die erhöhte Apoptoserate in Glioblastomzelllinien mit der MGMT-inhibierenden Wirkung der miRNA betrachtet, scheint das Ergebnis der funktionellen Assays erst einmal nicht intuitiv. Man sollte nämlich beachten, dass MGMT abseits der TMZ-Sensitivierung auch einen direkten Effekt auf die Tumorgenese und Apoptoserate der Zellen hat. Eine erniedrigte MGMT Expression könnte sogar die Entwicklung eines Glioms fördern. Eine erniedrigte MGMT Expression ist in nicht-neoplastischem Hirngewebe auch deutlich seltener, als in neoplastischem Hirngewebe [150]. So bewirkt zwar die Abwesenheit von MGMT ein höheres Zellabsterben durch TMZ, allerdings könnte es durch MGMT Mangel zu einer Akkumulation an Mutationen kommen, d.h. einen die Tumorentstehung fördernden Effekt auf die DNA haben [124]. Eine niedrige MGMT Expression ist andererseits nach Entstehung eines Glioblastoms aufgrund der sensitivierenden Wirkung für die Behandlung mit TMZ prognostisch günstig [67].

Zudem kommen bei der *hsa-miR-149-3p* vermittelten Apoptose-Steigerung weitere Zielproteine abseits von MGMT infrage, die die Apoptose steigern können. Bei *hsa-miR-221*, ebenfalls eine MGMT-regulierende miRNA, zeigte sich beispielsweise, dass es durch dessen Überexpression zu einem Anstieg von weiteren Markern von DNA-Schäden kam, wie z.B. Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), welche zu einer Steigerung der Apoptoserate führten [124]. Wenn man bedenkt, dass *hsa-miR-149-3p* durchaus weitere pro-apoptotische Signalwege in anderen Tumoren beeinflusst (siehe hierzu 4.6), wäre ein MGMT-unabhängiger Mechanismus der Apoptoseregulation durchaus wahrscheinlich.

Verwunderlich ist, dass die Zellvitalität durch Überexpression der *hsa-miR-149-3p* lediglich in der T98G Glioblastomzelllinie reduziert wurde. Neben einer offensichtlichen experimentellen Variabilität in den beiden LN-18 und A172 Zelllinien könnten grundlegende molekulare Unterschiede zwischen den Glioblastomzelllinien eine Rolle spielen. In den Zelllinien T98G und LN-18 liegt eine *TP53* Mutation vor, hingegen liegt bei

der Zelllinie A172 ein *TP53* Wildtyp vor. Zusätzlich haben die Zelllinien T98G und A172 eine *PTEN* Mutation, bei LN-18 wiederum gibt es keine Mutation im *PTEN* Gen [151, 152]. Wenn man bedenkt, dass das Vorliegen einer *TP53* Mutation darüber entscheidet, welcher apoptotische Signalweg eingegangen wird, ist vorstellbar, dass die genetischen Unterschiede einen Einfluss auf die Apoptose und Zellvitalität der Glioblastomzellen haben. Es zeigte sich, dass in *TP53*-mutierten Zelllinien der mitochondriale apoptotische Signalweg bei entsprechender Aktivierung initiiert wird, welcher langsamer und weniger effektiv abläuft als bei Zellen ohne *TP53* Mutation [148].

Die Zelllinie A172 hat einen methylierten *MGMT* Promotor und zeigt somit keine *MGMT* Expression. Daher ist die Zelllinie A172 TMZ sensibel [126, 128, 131, 153]. Interessant ist, dass die Überexpression der *hsa-miR-149-3p* eine Apoptose Steigerung auch in der Zelllinie A172 verursacht. Dies legt in der Tat nahe, dass die Apoptosesteigerung durch die Überexpression von *hsa-miR-149-3p* nicht abhängig von *MGMT* geschieht. Die Ergebnisse verdeutlichen die molekulare Heterogenität und das unterschiedliche biologische Verhalten von etablierten Glioblastomzelllinien. Nur in der Zelllinie T98G führte die Überexpression der *hsa-miR-149-3p* im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität.

4.6 Die miRNA *hsa-miR-149-3p* und ihre Rolle in Tumoren

Das *hsa-miR-149-3p* Gen ist auf dem Chromosom 2 intronisch im *Glypican-1* (*GPC1*) Gen lokalisiert [154, 155]. Durch die intronische Lokalisation der *hsa-miR-149-3p* erfolgt die Biogenese über einen alternativen Weg, bei dem aus einem *mitron* eine miRNA resultiert [82]. Okato *et al.* zeigten 2017, dass die *hsa-miR-149-3p* ebenfalls am Ago2 Protein bindet und somit Teil eines RISC Komplex ist [156]. Zahlreiche wissenschaftliche Publikationen haben sich mit Effekten der *hsa-miR-149-3p* in unterschiedlichen Tumorarten beschäftigt (Abb. 18).

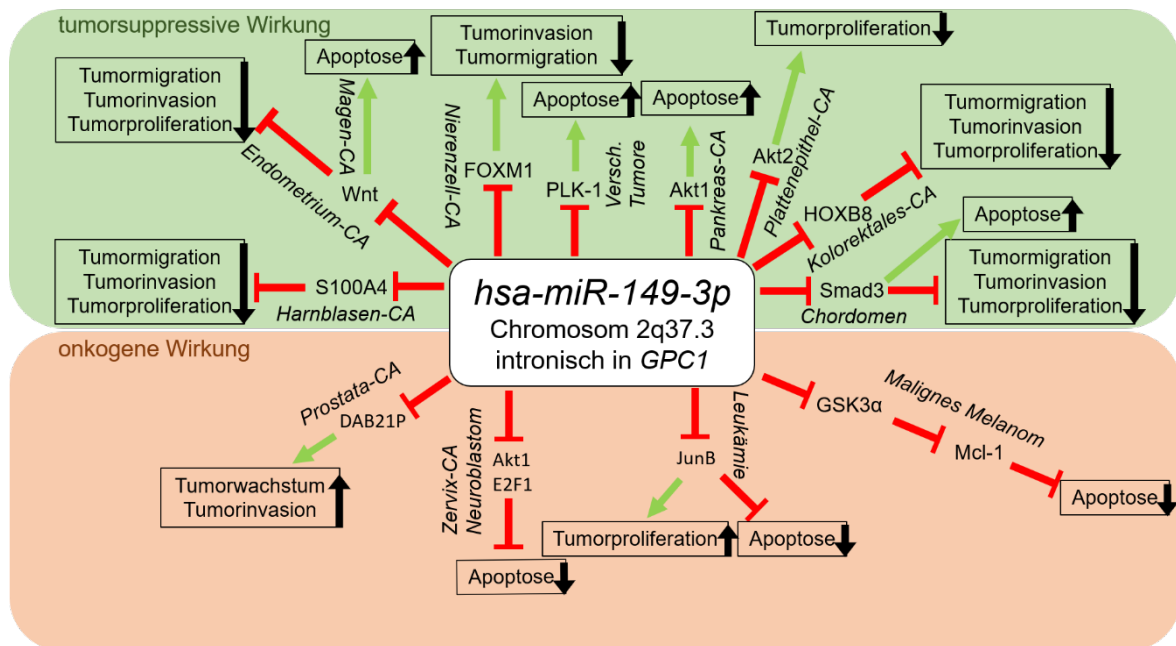


Abb. 18: Die onkogene und tumorsuppressive Wirkung der *hsa-miR-149-3p* ist abhängig von der Tumorentität.

Übersicht über *hsa-miR-149-3p* regulierte Zielgene mit einer *in vitro* oder *in vivo* nachgewiesene Wirkung in unterschiedlichen Tumoren. *Hsa-miR-149-3p* beeinflusst die Apoptose, das Wachstum, die Invasion, die Proliferation und die Migration in Magen-, Pankreas-, Cervix-, Prostata-, Nierenzell-, Endometrium-, Harnblasen-, oralen Plattenepithel- und kolorektalen Karzinomen (CA) sowie in Neuroblastomen, malignen Melanomen, Chordomen und Leukämien. Die jeweiligen Zielgene, über die die *hsa-miR-149-3p* ihre Wirkung entfaltet, können in verschiedenen Tumoren variieren. Zusätzlich ist ersichtlich, dass *hsa-miR-149-3p* in Abhängigkeit von der jeweiligen Tumorentität eine onkogene oder eine tumorsuppressive Wirkung entfalten kann. Beispielsweise wirkt die *hsa-miR-149-3p* in Pankreaskarzinomen tumorsuppressiv, während über das gleiche Zielgen im Zervixkarzinom eine anti-apoptotische Wirkung nachgewiesen werden konnte. Genauere Erklärungen sind dem Fließtext zu entnehmen. (GPC1: *Glypican-1*, FOXM1: *forkhead box M1*, PLK-1: *Polo-like kinase 1*, HOXB8: *homeobox protein Hox-B8*, GSK3α: Glykogensynthase-Kinase 3α, Mcl-1: *induced myeloid leukemia cell differentiation protein*) [135, 141, 155, 156, 160-163, 165-170, 173]

Jin *et al.* zeigten 2011 in Experimenten mit Melanomzellen *in vitro* und *ex vivo* die anti-apoptotische Wirkung der *hsa-miR-149-3p* [155]. Die Regulation der miRNA Expression erfolgt in diesen Zellen durch direkte Bindung des Proteins p53 an das *GPC1*. Hierbei führt eine erhöhte Konzentration von p53 im Rahmen der Endoplasmatisches Retikulum (ER)-Stressantwort zu einer erhöhten Konzentration von *hsa-miR-149-3p*. Die miRNA inhibiert dann die Glykogensynthase-Kinase 3α (GSK3α), welche dann nicht mehr das *Induced myeloid leukemia cell differentiation protein* (Mcl-1) hemmen kann. Die vermehrte Mcl-1 Expression führt zu einem höheren Zellüberleben durch eine geringere Apoptoserate [155]. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass *hsa-miR-149-3p* als Biomarker zur Erkennung von Melanomen herangezogen werden kann, da *hsa-miR-149-3p* als Teil einer drei-miRNA-Signatur eine präzisere Diagnosestellung ermöglicht [157]. Auch in anderen Tumoren wurde die Expression von *hsa-miR-149-3p* als molekularer Marker

beschrieben. In Ovarialkarzinomen ermöglicht das Expressionsniveau der *hsa-miR-149-3p* eine Einschätzung der Prognose. Je höher die Expression dieser miRNA im Peritoneum von Ovarialkarzinompatientinnen ist, desto kürzer das Patientenüberleben [158]. Eine weitere onkogene Wirkung von *hsa-miR-149-3p* ließ sich in T-Zell akuten lymphatischen Leukämie (T-ALL) Zelllinien darstellen [141]. *Hsa-miR-149-3p* hemmt die Expression von JunB und eine negative Korrelation zu p21 wurde nachgewiesen. Diese Effekte führten zu einem schlechteren Ansprechen der Tumorzellen auf die T-ALL Therapie *in vitro*. Die Transfektion mit *hsa-miR-149-3p* führte zusätzlich zu einer Erhöhung der Proteinexpression von CyclinD1, 4EBP1 und p70s6k in T-ALL Zelllinien [141]. In Neuroblastom- und in Zervixkarzinomzelllinien konnten Zielgene der *hsa-miR-149-3p* experimentell nachgewiesen werden [135]. Über die Inhibierung der Akt1 und E2F1 Expression auf Transkript und Proteinebene konnten pro-apoptotische Effekte nachgewiesen werden [135]. Bei Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom ist eine hohe *hsa-miR-149-3p* Expression ein prognostisch günstiger Faktor [159]. Das Protein PARP-2 wird durch Expression von *hsa-miR-149-3p* reguliert und eine Inhibierung der PARP-2 Expression führte zu einem besseren Ansprechen auf die Radio- und Chemotherapie in Tumoren *in vivo* [159]. In Prostatakarzinomen resultierte die onkogene Wirkung aus der Inhibierung des DAB2IP Proteins durch eine überexprimierte *hsa-miR-149-3p*, wodurch es zu einer Förderung des Tumorwachstums und der Tumordinvasion kam [160, 161].

Die Effekte einer miRNA können abhängig von der Tumorentität sehr unterschiedlich und gegensätzlich ausfallen. Bisher wurde hier die onkogene Wirkung der *hsa-miR-149-3p* beschrieben, allerdings konnten auch zahlreiche tumorsuppressive Effekte der *hsa-miR-149-3p* nachgewiesen werden. In Magen- und kolorektalen Karzinomen zeigte sich diese miRNA als zellzyklus-, zellmigrations- und zellinvasionshemmend sowie als Apoptose-induzierend [162, 163]. In Magentumoren wurde das Protein Wnt-1 als Zielstruktur von *hsa-miR-149-3p* identifiziert und die lange nicht-kodierende RNA (lncRNA) *Zinc finger E-box-binding homeobox 1 Antisense RNA 1* (ZEB1-AS1) als *hsa-miR-149-3p* regulierend [162, 163]. Bei kolorektalen Tumoren erwies sich das Protein *Homeobox protein Hox-B8* (HOXB8) als durch *hsa-miR-149-3p* reguliert und die lncRNA *MAFG-AS1* *hsa-miR-149-3p* regulierend [164]. Die HOXB Proteinfamilie zeigte auch in Endometriumkarzinomen eine Interaktion mit [165]*hsa-miR-149-3p* über den Wnt/ β -catenin Signalweg eine Hemmung des Zellzyklus, der Zellmigration und der Zellinvasion bewirkt [165]. Der Effekt der *hsa-miR-149-3p* wurde auch in Chordomen als tumorsuppressiv

vermutet, da die Expression von *hsa-miR-149-3p* verglichen mit der in nicht tumorös veränderter *Chorda dorsalis* vermindert ist [166, 167]. Viele potenzielle Zielgene im *mitogen-activated protein-Kinase-Weg* (MAP-Kinase-Weg) wurden in Chordomen aufgedeckt, welche den tumorsuppressiven Effekt erklären könnten. Als *in vitro* gesichertes Zielgen stellte sich zusätzlich das Smad3 Protein heraus. Eine Überexpression von *hsa-miR-149-3p* führte zu einer pro-apoptischen, zellinvasions-, zellvitalitäts-, und zellmigrationshemmenden Wirkung über die Herunterregulierung des Smad3 Proteins [166, 167]. Auch im Nierenzellkarzinom zeigte die *hsa-miR-149-3p* eine tumorsuppressive Wirkung durch Inhibierung der Zellinvasion und -migration durch Regulation von *Forkhead box M1 (FOXMI)* [156]. Shin *et al.* zeigten 2017 wie die *hsa-miR-149-3p* mittels Bindung an die 3'-UTR der *Polo-like kinase 1 (PLK-1)* einen apoptotischen Effekt in verschiedenen Tumorarten verursacht [168]. Ebenfalls spannend ist die Publikation von Si *et al.* 2017, bei der durch das Phytotherapeutikum Dioscin eine Hochregulation der *hsa-miR-149-3p* hervorgerufen werden konnte [169]. Über diese vermehrte *hsa-miR-149-3p* Expression zeigte sich mittels direkter Bindung der miRNA an die *Akt1* mRNA ein pro-apoptischer Effekt, der in zwei humanen Pankreastumorzelllinien *in vivo* nachgewiesen werden konnte [169]. In oralen Plattenepithelkarzinomen wurde durch die negative Regulierung von *Akt2* durch *hsa-miR-149-3p* eine Inhibierung der Tumorzellproliferation erreicht, wodurch sogar eine chemotherapeutische Sensibilisierung zu 5-Fluorouracil erreicht werden konnte [170]. Bei Versuchen mit Ösophaguskarzinomzelllinien ließ sich experimentell nachweisen, dass die Überexpression der *hsa-miR-149-3p* die Cisplatin-Sensitivität über die direkte Hemmung der DNA Polymerase β erhöht [171]. Einen Effekt von *hsa-miR-149-3p* auf die Cisplatin-Sensitivität in Kolonkarzinomen wiesen Liu *et al.* nach [172]. Dabei konnte das Protein *Methyltransferase-like 1 (METTL1)* die Cisplatin-Sensitivität erhöhen, in dem es *hsa-miR-149-3p* hochregulierte. Durch diese Überexpression von *hsa-miR-149-3p* kam es wiederum zur Inhibierung der S100A4/p53-Achse [172]. In Harnblasentumoren zeigte *hsa-miR-149-3p* einen inhibitorischen Effekt auf die Zellproliferation, -migration und -invasion durch direkte Regulation des *S100A4* Gen [173]. Zusätzlich bedeutsam ist hierbei, welche Faktoren die Expression der *hsa-miR-149-3p* beeinflussen. Das Phytotherapeutikum Dioscin als *hsa-miR-149-3p* expressionsfördernd wurde soeben bereits thematisiert [169]. Auch wurde das Antiarrhythmikum Chinidin, ein Kalium-Kanal-Blocker, bereits als *hsa-miR-149-3p* expressionsfördernd in Glioblastomzelllinien nachgewiesen [174].

Die oben genannten mannigfaltigen Effekte der *hsa-miR-149-3p* zeigen klar, dass die zellulären Effekte dieser miRNA von der jeweiligen Tumorgart abhängig ist. In der hier vorliegenden Arbeit konnte durch funktionelle *in vitro*-Analysen erstmalig gezeigt werden, dass die miRNA *hsa-miR-149-3p* eine pro-apoptotische Wirkung in Glioblastomzellen hat.

4.7 Schlussfolgerungen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit *hsa-miR-149-3p* eine neue, bisher nicht als MGMT-regulierend beschriebene miRNA identifiziert werden, die die MGMT Expression auf Transkript- und Proteinebene in Glioblastomzellen beeinflusst. Die Regulation der MGMT Expression erfolgt dabei durch eine direkte Bindung der miRNA an die 3'-UTR von MGMT. Ein Effekt der *hsa-miR-149-3p* Überexpression auf die TMZ-Resistenz von Glioblastomzellen war allerdings weder in dieser Arbeit noch in anderen Publikationen experimentell nachzuweisen. Jedoch wirkte die alleinige Überexpression dieser miRNA in Glioblastomzellen pro-apoptotisch.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Zulch, K.J., *Principles of the new World Health Organization (WHO) classification of brain tumors*. *Neuroradiology*, 1980. **19**(2): p. 59-66.
2. Ostrom, Q.T., H. Gittleman, P. Farah, A. Ondracek, Y. Chen, Y. Wolinsky, N.E. Stroup, C. Kruchko, and J.S. Barnholtz-Sloan, *CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010*. *Neuro Oncol*, 2013. **15 Suppl 2**: p. ii1-56.
3. Surawicz, T.S., B.J. McCarthy, V. Kupelian, P.J. Jukich, J.M. Bruner, and F.G. Davis, *Descriptive epidemiology of primary brain and CNS tumors: results from the Central Brain Tumor Registry of the United States, 1990-1994*. *Neuro Oncol*, 1999. **1**(1): p. 14-25.
4. Schaff, L.R., D. Yan, S. Thyparambil, Y. Tian, F. Cecchi, M. Rosenblum, A.S. Reiner, K.S. Panageas, T. Hembrough, and A.L. Lin, *Characterization of MGMT and EGFR protein expression in glioblastoma and association with survival*. *J Neurooncol*, 2020. **146**(1): p. 163-170.
5. Little, M.P., F. de Vathaire, A. Shamsaldin, O. Oberlin, S. Campbell, E. Grimaud, J. Chavaudra, R.G. Haylock, and C.R. Muirhead, *Risks of brain tumour following treatment for cancer in childhood: modification by genetic factors, radiotherapy and chemotherapy*. *Int J Cancer*, 1998. **78**(3): p. 269-275.
6. Neglia, J.P., A.T. Meadows, L.L. Robison, T.H. Kim, W.A. Newton, F.B. Ruymann, H.N. Sather, and G.D. Hammond, *Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood*. *N Engl J Med*, 1991. **325**(19): p. 1330-1336.
7. Louis, D.N., *WHO classification of tumours of the central nervous system*. revised 4th edition ed, ed. D.N. Louis, *et al.* 2016, Lyon: International Agency for Research on Cancer. p. 28-56.
8. Omuro, A. and L.M. DeAngelis, *Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review*. *JAMA*, 2013. **310**(17): p. 1842-1850.
9. Wick, W., O. Menn, C. Meisner, J. Steinbach, M. Hermisson, M. Tatagiba, and M. Weller, *Pharmacotherapy of epileptic seizures in glioma patients: who, when, why and how long?* *Onkologie*, 2005. **28**(8-9): p. 391-396.
10. Sizoo, E.M., L. Braam, T.J. Postma, H.R. Pasman, J.J. Heimans, M. Klein, J.C. Reijneveld, and M.J. Taphoorn, *Symptoms and problems in the end-of-life phase of high-grade glioma patients*. *Neuro Oncol*, 2010. **12**(11): p. 1162-1166.
11. Ricci, P.E. and D.H. Dungan, *Imaging of low- and intermediate-grade gliomas*. *Semin Radiat Oncol*, 2011. **11**(2): p. 103-112.
12. Weller, M., M. van den Bent, K. Hopkins, J.C. Tonn, R. Stupp, A. Falini, E. Cohen-Jonathan-Moyal, D. Frappaz, R. Henriksson, C. Balana, O. Chinot, Z. Ram, G. Reifenberger, R. Soffietti, and W. Wick, *EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma*. *Lancet Oncol*, 2014. **15**(9): p. e395-403.

13. Wick, W., M. Platten, C. Meisner, J. Felsberg, G. Tabatabai, M. Simon, G. Nikkhah, K. Papsdorf, J.P. Steinbach, M. Sabel, S.E. Combs, J. Vesper, C. Braun, J. Meixensberger, R. Ketter, R. Mayer-Steinacker, G. Reifenberger, and M. Weller, *Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial*. *Lancet Oncol*, 2012. **13**(7): p. 707-715.
14. Sanai, N., M.Y. Polley, M.W. McDermott, A.T. Parsa, and M.S. Berger, *An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas*. *J Neurosurg*, 2011. **115**(1): p. 3-8.
15. Stummer, W., U. Pichlmeier, T. Meinel, O.D. Wiestler, F. Zanella, and H.J. Reulen, *Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial*. *Lancet Oncol*, 2006. **7**(5): p. 392-401.
16. Senft, C., A. Bink, K. Franz, H. Vatter, T. Gasser, and V. Seifert, *Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial*. *The Lancet Oncology*, 2011. **12**(11): p. 997-1003.
17. Solheim, O., T. Selbekk, A.S. Jakola, and G. Unsgård, *Ultrasound-guided operations in unselected high-grade gliomas—overall results, impact of image quality and patient selection*. *Acta Neurochirurgica*, 2010. **152**(11): p. 1873-1886.
18. Schucht, P., K. Seidel, J. Beck, M. Murek, A. Jilch, R. Wiest, C. Fung, and A. Raabe, *Intraoperative monopolar mapping during 5-ALA-guided resections of glioblastomas adjacent to motor eloquent areas: evaluation of resection rates and neurological outcome*. *Neurosurg Focus*, 2014. **37**(6): p. 1-8.
19. Stupp, R., W.P. Mason, M.J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M.J. Taphoorn, K. Belanger, A.A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R.C. Janzer, S.K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J.G. Cairncross, E. Eisenhauer, and R.O. Mirimanoff, *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(10): p. 987-996.
20. Laperriere, N., L. Zuraw, and G. Cairncross, *Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review*. *Radiother Oncol*, 2002. **64**(3): p. 259-273.
21. Denny, B.J., R.T. Wheelhouse, M.F. Stevens, L.L. Tsang, and J.A. Slack, *NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA*. *Biochemistry*, 1994. **33**(31): p. 9045-9051.
22. Mutter, N. and R. Stupp, *Temozolomide: a milestone in neuro-oncology and beyond?* *Expert Rev Anticancer Ther*, 2006. **6**(8): p. 1187-1204.
23. Ochs, K. and B. Kaina, *Apoptosis induced by DNA Damage O-Methylguanine is Bcl-2 and Caspase-9/3 regulated and Fas/Caspase-8 independent*. *Cancer research*, 2000. **60**(20): p. 5815-5824.
24. Tominaga, Y., T. Tsuzuki, A. Shiraishi, H. Kawate, and M. Sekiguchi, *Alkylation-induced apoptosis of embryonic stem cells in which the gene for DNA-repair, methyltransferase, had been disrupted by gene targeting*. *Carcinogenesis*, 1997. **18**(5): p. 889-896.

25. Taphoorn, M.J., R. Stupp, C. Coens, D. Osoba, R. Kortmann, M.J. van den Bent, W. Mason, R.O. Mirimanoff, B.G. Baumert, E. Eisenhauer, P. Forsyth, and A. Bottomley, *Health-related quality of life in patients with glioblastoma: a randomised controlled trial*. *Lancet Oncol*, 2005. **6**(12): p. 937-944.
26. Stupp, R., M.E. Hegi, W.P. Mason, M.J. van den Bent, M.J. Taphoorn, R.C. Janzer, S.K. Ludwin, A. Allgeier, B. Fisher, K. Belanger, P. Hau, A.A. Brandes, J. Gijtenbeek, C. Marosi, C.J. Vecht, K. Mokhtari, P. Wesseling, S. Villa, E. Eisenhauer, T. Gorlia, M. Weller, D. Lacombe, J.G. Cairncross, and R.O. Mirimanoff, *Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial*. *Lancet Oncol*, 2009. **10**(5): p. 459-466.
27. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Epidemiology and etiology of gliomas*. *Acta Neuropathol*, 2005. **109**(1): p. 93-108.
28. Louis, D.N., A. Perry, G. Reifenberger, A. von Deimling, D. Figarella-Branger, W.K. Cavenee, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, P. Kleihues, and D.W. Ellison, *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. *Acta Neuropathol*, 2016. **131**(6): p. 803-820.
29. Nobusawa, S., T. Watanabe, P. Kleihues, and H. Ohgaki, *IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(19): p. 6002-6007.
30. Nounshmehr, H., D.J. Weisenberger, K. Diefes, H.S. Phillips, K. Pujara, B.P. Berman, F. Pan, C.E. Pelloski, E.P. Sulman, K.P. Bhat, R.G. Verhaak, K.A. Hoadley, D.N. Hayes, C.M. Perou, H.K. Schmidt, L. Ding, R.K. Wilson, D. Van Den Berg, H. Shen, H. Bengtsson, P. Neuvial, L.M. Cope, J. Buckley, J.G. Herman, S.B. Baylin, P.W. Laird, and K. Aldape, *Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma*. *Cancer Cell*, 2010. **17**(5): p. 510-522.
31. Hartmann, C., B. Hentschel, W. Wick, D. Capper, J. Felsberg, M. Simon, M. Westphal, G. Schackert, R. Meyermann, T. Pietsch, G. Reifenberger, M. Weller, M. Loeffler, and A. von Deimling, *Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas*. *Acta Neuropathol*, 2010. **120**(6): p. 707-718.
32. Parsons, D.W., S. Jones, X. Zhang, J.C. Lin, R.J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, I.M. Siu, G.L. Gallia, A. Olivi, R. McLendon, B.A. Rasheed, S. Keir, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, D.A. Busam, H. Tekleab, L.A. Diaz, Jr., J. Hartigan, D.R. Smith, R.L. Strausberg, S.K. Marie, S.M. Shinjo, H. Yan, G.J. Riggins, D.D. Bigner, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V.E. Velculescu, and K.W. Kinzler, *An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme*. *Science*, 2008. **321**(5897): p. 1807-1812.
33. Yan, H., D.W. Parsons, G. Jin, R. McLendon, B.A. Rasheed, W. Yuan, I. Kos, I. Batinic-Haberle, S. Jones, G.J. Riggins, H. Friedman, A. Friedman, D. Reardon, J. Herndon, K.W. Kinzler, V.E. Velculescu, B. Vogelstein, and D.D. Bigner, *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(8): p. 765-773.

34. Network, T.C.G.A.R., *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1061-1068.
35. Ohgaki, H., P. Dessen, B. Jourde, S. Horstmann, T. Nishikawa, P.L. Di Patre, C. Burkhard, D. Schuler, N.M. Probst-Hensch, P.C. Maiorka, N. Baeza, P. Pisani, Y. Yonekawa, M.G. Yasargil, U.M. Lutolf, and P. Kleihues, *Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 6892-6899.
36. Brennan, C.W., R.G. Verhaak, A. McKenna, B. Campos, H. Nouseh, S.R. Salama, S. Zheng, D. Chakravarty, J.Z. Sanborn, S.H. Berman, R. Beroukhi, B. Bernard, C.J. Wu, G. Genovese, I. Shmulevich, J. Barnholtz-Sloan, L. Zou, R. Vegesna, S.A. Shukla, G. Ciriello, W.K. Yung, W. Zhang, C. Sougnez, T. Mikkelsen, K. Aldape, D.D. Bigner, E.G. Van Meir, M. Prados, A. Sloan, K.L. Black, J. Eschbacher, G. Finocchiaro, W. Friedman, D.W. Andrews, A. Guha, M. Iacocca, B.P. O'Neill, G. Foltz, J. Myers, D.J. Weisenberger, R. Penny, R. Kucherlapati, C.M. Perou, D.N. Hayes, R. Gibbs, M. Marra, G.B. Mills, E. Lander, P. Spellman, R. Wilson, C. Sander, J. Weinstein, M. Meyerson, S. Gabriel, P.W. Laird, D. Haussler, G. Getz, and L. Chin, *The somatic genomic landscape of glioblastoma*. Cell, 2013. **155**(2): p. 462-477.
37. Knobbe, C.B. and G. Reifenberger, *Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas*. Brain Pathol, 2003. **13**(4): p. 507-518.
38. Crespo, I., A.L. Vital, A.B. Nieto, O. Rebelo, H. Tão, M.C. Lopes, C.R. Oliveira, P.J. French, A. Orfao, and M.D. Taberner, *Detailed characterization of alterations of chromosomes 7, 9, and 10 in glioblastomas as assessed by single-nucleotide polymorphism arrays*. The Journal of molecular diagnostics : JMD, 2011. **13**(6): p. 634-647.
39. Bai, H., A.S. Harmanci, E.Z. Erson-Omay, J. Li, S. Coşkun, M. Simon, B. Kriscsek, K. Özdoğan, S.B. Omay, E.A. Sorensen, Ş. Turcan, M. Bakırcıoğlu, G. Carrión-Grant, P.B. Murray, V.E. Clark, A.G. Ercan-Sencicek, J. Knight, L. Sencar, S. Altınok, L.D. Kaulen, B. Gülez, M. Timmer, J. Schramm, K. Mishra-Gorur, O. Henegariu, J. Moliterno, A. Louvi, T.A. Chan, S.L. Tannheimer, M.N. Pamir, A.O. Vortmeyer, K. Bilguvar, K. Yasuno, and M. Günel, *Integrated genomic characterization of IDH1-mutant glioma malignant progression*. Nature genetics, 2016. **48**(1): p. 59-66.
40. Suzuki, H., K. Aoki, K. Chiba, Y. Sato, Y. Shiozawa, Y. Shiraishi, T. Shimamura, A. Niida, K. Motomura, F. Ohka, T. Yamamoto, K. Tanahashi, M. Ranjit, T. Wakabayashi, T. Yoshizato, K. Kataoka, K. Yoshida, Y. Nagata, A. Sato-Otsubo, H. Tanaka, M. Sanada, Y. Kondo, H. Nakamura, M. Mizoguchi, T. Abe, Y. Muragaki, R. Watanabe, I. Ito, S. Miyano, A. Natsume, and S. Ogawa, *Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas*. Nat Genet, 2015. **47**(5): p. 458-468.
41. Network, T.C.G.A.R., *Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas*. New England Journal of Medicine, 2015. **372**(26): p. 2481-2498.
42. Brat, D.J., K. Aldape, H. Colman, D. Figarella-Branger, G.N. Fuller, C. Giannini, E.C. Holland, R.B. Jenkins, B. Kleinschmidt-DeMasters, T. Komori, J.M. Kros, D.N. Louis, C. McLean, A. Perry, G. Reifenberger, C. Sarkar, R. Stupp, M.J. van den Bent,

- A. von Deimling, and M. Weller, *cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas*. *Acta Neuropathol*, 2020. **139**(3): p. 603-608.
43. Karran, P., T. Lindahl, and B. Griffin, *Adaptive response to alkylating agents involves alteration in situ of O6-methylguanine residues in DNA*. *Nature*, 1979. **280**(5717): p. 76-77.
44. Belanich, M., T. Randall, M.A. Pastor, J.T. Kibitel, L.G. Alas, M.E. Dolan, S.C. Schold, Jr., M. Gander, F.J. Lejeune, B.F. Li, A.B. White, P. Wasserman, M.L. Citron, and D.B. Yarosh, *Intracellular Localization and intercellular heterogeneity of the human DNA repair protein O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1996. **37**(6): p. 547-555.
45. Costello, J.F., B.W. Futscher, K. Tano, D.M. Graunke, and R.O. Pieper, *Graded methylation in the promoter and body of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) gene correlates with MGMT expression in human glioma cells*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(25): p. 17228-17237.
46. Nakagawachi, T., H. Soejima, T. Urano, W. Zhao, K. Higashimoto, Y. Satoh, S. Matsukura, S. Kudo, Y. Kitajima, H. Harada, K. Furukawa, H. Matsuzaki, M. Emi, Y. Nakabeppu, K. Miyazaki, M. Sekiguchi, and T. Mukai, *Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer*. *Oncogene*, 2003. **22**(55): p. 8835-8844.
47. Bady, P., D. Sciuscio, A.-C. Diserens, J. Bloch, M.J. van den Bent, C. Marosi, P.-Y. Dietrich, M. Weller, L. Mariani, F.L. Heppner, D.R. McDonald, D. Lacombe, R. Stupp, M. Delorenzi, and M.E. Hegi, *MGMT methylation analysis of glioblastoma on the Infinium methylation BeadChip identifies two distinct CpG regions associated with gene silencing and outcome, yielding a prediction model for comparisons across datasets, tumor grades, and CIMP-status*. *Acta Neuropathologica*, 2012. **124**(4): p. 547-560.
48. Esteller, M., S.R. Hamilton, P.C. Burger, S.B. Baylin, and J.G. Herman, *Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia*. *Cancer Res*, 1999. **59**(4): p. 793-797.
49. Gardiner-Garden, M. and M. Frommer, *CpG islands in vertebrate genomes*. *J Mol Biol*, 1987. **196**(2): p. 261-282.
50. Harris, L.C., P.M. Potter, K. Tano, S. Shiota, S. Mitra, and T.P. Brent, *Characterization of the promoter region of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene*. *Nucleic acids research*, 1991. **19**(22): p. 6163-6167.
51. Herman, J.G., J.R. Graff, S. Myohanen, B.D. Nelkin, and S.B. Baylin, *Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(18): p. 9821-9826.
52. Grasbon-Frodl, E.M., F.W. Kreth, M. Ruitter, O. Schnell, K. Bise, J. Felsberg, G. Reifenberger, J.C. Tonn, and H.A. Kretzschmar, *Intratumoral homogeneity of MGMT promoter hypermethylation as demonstrated in serial stereotactic specimens from anaplastic astrocytomas and glioblastomas*. *Int J Cancer*, 2007. **121**(11): p. 2458-2464.

53. Preusser, M., A.S. Berghoff, C. Manzl, M. Filipits, A. Weinhäusel, W. Pulverer, K. Dieckmann, G. Widhalm, A. Wöhrer, E. Knosp, C. Marosi, and J.A. Hainfellner, *Clinical Neuropathology practice news 1-2014: pyrosequencing meets clinical and analytical performance criteria for routine testing of MGMT promoter methylation status in glioblastoma*. *Clinical neuropathology*, 2014. **33**(1): p. 6-14.
54. Hegi, M.E., A.C. Diserens, T. Gorlia, M.F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J.M. Kros, J.A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J.E. Bromberg, P. Hau, R.O. Mirimanoff, J.G. Cairncross, R.C. Janzer, and R. Stupp, *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
55. Hegi, M.E., A.C. Diserens, S. Godard, P.Y. Dietrich, L. Regli, S. Ostermann, P. Otten, G. Van Melle, N. de Tribolet, and R. Stupp, *Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(6): p. 1871-1874.
56. Reifenberger, G., B. Hentschel, J. Felsberg, G. Schackert, M. Simon, O. Schnell, M. Westphal, W. Wick, T. Pietsch, M. Loeffler, and M. Weller, *Predictive impact of MGMT promoter methylation in glioblastoma of the elderly*. *Int J Cancer*, 2012. **131**(6): p. 1342-1350.
57. Lakomy, R., J. Sana, S. Hankeova, P. Fadrus, L. Kren, E. Lzicarova, M. Svoboda, H. Dolezelova, M. Smrcka, R. Vyzula, J. Michalek, M. Hajduch, and O. Slaby, *MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients*. *Cancer Sci*, 2011. **102**(12): p. 2186-2190.
58. Melguizo, C., J. Prados, B. González, R. Ortiz, A. Concha, P.J. Alvarez, R. Madeddu, G. Perazzoli, J.A. Oliver, R. López, F. Rodríguez-Serrano, and A. Aránega, *MGMT promoter methylation status and MGMT and CD133 immunohistochemical expression as prognostic markers in glioblastoma patients treated with temozolomide plus radiotherapy*. *J Transl Med*, 2012. **10**: p. 250.
59. Cabrini, G., E. Fabbri, C. Lo Nigro, M.C. Dehecchi, and R. Gambari, *Regulation of expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and the treatment of glioblastoma (Review)*. *Int J Oncol*, 2015. **47**(2): p. 417-428.
60. Lavon, I., D. Fuchs, D. Zrihan, G. Efroni, B. Zelikovitch, Y. Fellig, and T. Siegal, *Novel mechanism whereby nuclear factor kappaB mediates DNA damage repair through regulation of O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase*. *Cancer Res*, 2007. **67**(18): p. 8952-8959.
61. Bocangel, D., S. Sengupta, S. Mitra, and K.K. Bhakat, *p53-Mediated down-regulation of the human DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) via interaction with Sp1 transcription factor*. *Anticancer Res*, 2009. **29**(10): p. 3741-3750.
62. Boldogh, I., C.V. Ramana, Z. Chen, T. Biswas, T.K. Hazra, S. Grosch, T. Grombacher, S. Mitra, and B. Kaina, *Regulation of expression of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase via protein kinase C-mediated signaling*. *Cancer Res*, 1998. **58**(17): p. 3950-3956.

63. Bhakat, K.K. and S. Mitra, *Regulation of the human O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene by transcriptional coactivators cAMP response element-binding protein-binding protein and p300*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34197-34204.
64. Danam, R.P., S.R. Howell, T.P. Brent, and L.C. Harris, *Epigenetic regulation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression by histone acetylation and methyl-CpG binding proteins*. Mol Cancer Ther, 2005. **4**(1): p. 61-69.
65. Zhao, W., H. Soejima, K. Higashimoto, T. Nakagawachi, T. Urano, S. Kudo, S. Matsukura, S. Matsuo, K. Joh, and T. Mukai, *The essential role of histone H3 Lys9 di-methylation and MeCP2 binding in MGMT silencing with poor DNA methylation of the promoter CpG island*. J Biochem, 2005. **137**(3): p. 431-440.
66. Dahlrot, R.H., J. Dowsett, S. Fosmark, A. Malmström, R. Henriksson, H. Boldt, K. de Stricker, M.D. Sørensen, H.S. Poulsen, M. Lysiak, P. Söderkvist, J. Rosell, S. Hansen, and B.W. Kristensen, *Prognostic value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) protein expression in glioblastoma excluding nontumour cells from the analysis*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2018. **44**(2): p. 172-184.
67. Lalezari, S., A.P. Chou, A. Tran, O.E. Solis, N. Khanlou, W. Chen, S. Li, J.A. Carrillo, R. Chowdhury, J. Selfridge, D.E. Sanchez, R.W. Wilson, M. Zurayk, J. Lalezari, J.J. Lou, L. Ormiston, K. Ancheta, R. Hanna, P. Miller, D. Piccioni, B.M. Ellingson, C. Buchanan, P.S. Mischel, P.L. Nghiemphu, R. Green, H.J. Wang, W.B. Pope, L.M. Liau, R.M. Elashoff, T.F. Cloughesy, W.H. Yong, and A. Lai, *Combined analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression and promoter methylation provides optimized prognostication of glioblastoma outcome*. Neuro Oncol, 2013. **15**(3): p. 370-381.
68. Ambros, V., B. Bartel, D.P. Bartel, C.B. Burge, J.C. Carrington, X. Chen, G. Dreyfuss, S.R. Eddy, S. Griffiths-Jones, M. Marshall, M. Matzke, G. Ruvkun, and T. Tuschl, *A uniform system for microRNA annotation*. RNA, 2003. **9**(3): p. 277-279.
69. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-854.
70. Reinhart, B.J., F.J. Slack, M. Basson, A.E. Pasquinelli, J.C. Bettinger, A.E. Rougvie, H.R. Horvitz, and G. Ruvkun, *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 901-906.
71. Baskerville, S. and D.P. Bartel, *Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes*. RNA, 2005. **11**(3): p. 241-247.
72. Tanzer, A. and P.F. Stadler, *Molecular evolution of a microRNA cluster*. J Mol Biol, 2004. **339**(2): p. 327-335.
73. Megraw, M., P. Sethupathy, B. Corda, and A.G. Hatzigeorgiou, *miRGen: a database for the study of animal microRNA genomic organization and function*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(Database issue): p. D149-155.
74. Duursma, A.M., M. Kedde, M. Schrier, C. le Sage, and R. Agami, *miR-148 targets human DNMT3b protein coding region*. Rna, 2008. **14**(5): p. 872-877.

75. Lee, Y., K. Jeon, J.T. Lee, S. Kim, and V.N. Kim, *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. The EMBO Journal, 2002. **21**(17): p. 4663-4670.
76. Lee, Y., M. Kim, J. Han, K.H. Yeom, S. Lee, S.H. Baek, and V.N. Kim, *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 4051-4060.
77. Gregory, R.I., K.P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch, and R. Shiekhattar, *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 235-240.
78. Yi, R., Y. Qin, I.G. Macara, and B.R. Cullen, *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. Genes & development, 2003. **17**(24): p. 3011-3016.
79. Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim, and V.N. Kim, *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-419.
80. Bernstein, E., A.A. Caudy, S.M. Hammond, and G.J. Hannon, *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 363-366.
81. Provost, P., D. Dishart, J. Doucet, D. Frendewey, B. Samuelsson, and O. Rådmark, *Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer*. The EMBO journal, 2002. **21**(21): p. 5864-5874.
82. Okamura, K., J.W. Hagen, H. Duan, D.M. Tyler, and E.C. Lai, *The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila*. Cell, 2007. **130**(1): p. 89-100.
83. Ruby, J.G., C.H. Jan, and D.P. Bartel, *Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing*. Nature, 2007. **448**(7149): p. 83-86.
84. Gregory, R.I., T.P. Chendrimada, N. Cooch, and R. Shiekhattar, *Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing*. Cell, 2005. **123**(4): p. 631-640.
85. Chendrimada, T.P., R.I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura, and R. Shiekhattar, *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 740-744.
86. Wu, L., J. Fan, and J.G. Belasco, *MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(11): p. 4034-4039.
87. Lai, E.C., *Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation*. Nature Genetics, 2002. **30**: p. 363-364.
88. Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello, *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-811.
89. Hammond, S.M., E. Bernstein, D. Beach, and G.J. Hannon, *An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells*. Nature, 2000. **404**(6775): p. 293-296.

90. Olsen, P.H. and V. Ambros, *The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in Caenorhabditis elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation*. Dev Biol, 1999. **216**(2): p. 671-680.
91. Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell, 2005. **120**(1): p. 15-20.
92. Chan, J.A., A.M. Krichevsky, and K.S. Kosik, *MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells*. Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 6029-6033.
93. Slaby, O., R. Lakomy, P. Fadrus, R. Hrstka, L. Kren, E. Lzicarova, M. Smrcka, M. Svoboda, H. Dolezalova, J. Novakova, D. Valik, R. Vyzula, and J. Michalek, *MicroRNA-181 family predicts response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide in glioblastoma patients*. Neoplasma, 2010. **57**(3): p. 264-269.
94. Fang, L., Z. Deng, T. Shatseva, J. Yang, C. Peng, W.W. Du, A.J. Yee, L.C. Ang, C. He, S.W. Shan, and B.B. Yang, *MicroRNA miR-93 promotes tumor growth and angiogenesis by targeting integrin- β 8*. Oncogene, 2011. **30**(7): p. 806-821.
95. Ciafrè, S.A., S. Galardi, A. Mangiola, M. Ferracin, C.G. Liu, G. Sabatino, M. Negrini, G. Maira, C.M. Croce, and M.G. Farace, *Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **334**(4): p. 1351-1358.
96. Shi, L., Z. Cheng, J. Zhang, R. Li, P. Zhao, Z. Fu, and Y. You, *hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells*. Brain Res, 2008. **1236**: p. 185-93.
97. Wu, Z., L. Sun, H. Wang, J. Yao, C. Jiang, W. Xu, and Z. Yang, *MiR-328 Expression Is Decreased in High-Grade Gliomas and Is Associated with Worse Survival in Primary Glioblastoma*. PLOS ONE, 2012. **7**(10): p. e47270.
98. Malzkorn, B., M. Wolter, F. Liesenberg, M. Grzendowski, K. Stuhler, H.E. Meyer, and G. Reifenberger, *Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas*. Brain Pathol, 2010. **20**(3): p. 539-550.
99. Barbano, R., O. Palumbo, B. Pasculli, M. Galasso, S. Volinia, V. D'Angelo, N. Icolaro, M. Coco, L. Dimitri, P. Graziano, M. Copetti, V.M. Valori, E. Maiello, M. Carella, V.M. Fazio, and P. Parrella, *A miRNA signature for defining aggressive phenotype and prognosis in gliomas*. PLOS ONE, 2014. **9**(10): p. e108950.
100. Godlewski, J., M.O. Nowicki, A. Bronisz, G. Nuovo, J. Palatini, M. De Lay, J. Van Brocklyn, M.C. Ostrowski, E.A. Chiocca, and S.E. Lawler, *MicroRNA-451 regulates LKB1/AMPK signaling and allows adaptation to metabolic stress in glioma cells*. Mol Cell, 2010. **37**(5): p. 620-632.
101. Franceschi, S., C.M. Mazzanti, F. Lessi, P. Aretini, F.G. Carbone, L.A.F. M, C. Scatena, V. Ortenzi, R. Vannozzi, G. Fanelli, F. Pasqualetti, G. Bevilacqua, K. Zavaglia, and A.G. Naccarato, *Investigating molecular alterations to profile short- and long-term recurrence-free survival in patients with primary glioblastoma*. Oncol Lett, 2015. **10**(6): p. 3599-3606.
102. Niyazi, M., A. Pitea, M. Mittelbronn, J. Steinbach, C. Sticht, F. Zehentmayr, D. Piehlmaier, H. Zitzelsberger, U. Ganswindt, C. Rodel, K. Lauber, C. Belka, and K.

- Unger, *A 4-miRNA signature predicts the therapeutic outcome of glioblastoma*. *Oncotarget*, 2016. **7**(29): p. 45764-45775.
103. Srinivasan, S., I.R.P. Patric, and K. Somasundaram, *A Ten-microRNA Expression Signature Predicts Survival in Glioblastoma*. *PLOS ONE*, 2011. **6**(3): p. e17438.
104. Hayes, J., H. Thygesen, C. Tumilson, A. Droop, M. Boissinot, T.A. Hughes, D. Westhead, J.E. Alder, L. Shaw, S.C. Short, and S.E. Lawler, *Prediction of clinical outcome in glioblastoma using a biologically relevant nine-microRNA signature*. *Mol Oncol*, 2015. **9**(3): p. 704-714.
105. Niyazi, M., F. Zehentmayr, O.M. Niemoller, S. Eigenbrod, H. Kretzschmar, K. Schulze-Osthoff, J.C. Tonn, M. Atkinson, S. Mortl, and C. Belka, *MiRNA expression patterns predict survival in glioblastoma*. *Radiat Oncol*, 2011. **6**: p. 153.
106. Sana, J., L. Radova, R. Lakomy, L. Kren, P. Fadrus, M. Smrcka, A. Besse, J. Nekvindova, M. Hermanova, R. Jancalek, M. Svoboda, M. Hajduch, P. Slampa, R. Vyzula, and O. Slaby, *Risk Score based on microRNA expression signature is independent prognostic classifier of glioblastoma patients*. *Carcinogenesis*, 2014. **35**(12): p. 2756-2762.
107. Zhang, W., J. Zhang, W. Yan, G. You, Z. Bao, S. Li, C. Kang, C. Jiang, Y. You, Y. Zhang, C.C. Chen, S.W. Song, and T. Jiang, *Whole-genome microRNA expression profiling identifies a 5-microRNA signature as a prognostic biomarker in Chinese patients with primary glioblastoma multiforme*. *Cancer*, 2013. **119**(4): p. 814-824.
108. Cheng, W., X. Ren, J. Cai, C. Zhang, M. Li, K. Wang, Y. Liu, S. Han, and A. Wu, *A five-miRNA signature with prognostic and predictive value for MGMT promoter-methylated glioblastoma patients*. *Oncotarget*, 2015. **6**(30): p. 29285-29295.
109. Wang, Q., P. Li, A. Li, W. Jiang, H. Wang, J. Wang, and K. Xie, *Plasma specific miRNAs as predictive biomarkers for diagnosis and prognosis of glioma*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012. **31**(1): p. 97.
110. Yang, C., C. Wang, X. Chen, S. Chen, Y. Zhang, F. Zhi, J. Wang, L. Li, X. Zhou, N. Li, H. Pan, J. Zhang, K. Zen, C.Y. Zhang, and C. Zhang, *Identification of seven serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as potential noninvasive biomarkers for malignant astrocytomas*. *Int J Cancer*, 2013. **132**(1): p. 116-127.
111. Berthois, Y., C. Delfino, P. Metellus, F. Fina, I. Nanni-Metellus, H. Al Aswy, V. Pirisi, L. Ouafik, and F. Boudouresque, *Differential expression of miR200a-3p and miR21 in grade II-III and grade IV gliomas: evidence that miR200a-3p is regulated by O(6)-methylguanine methyltransferase and promotes temozolomide responsiveness*. *Cancer Biol Ther*, 2014. **15**(7): p. 938-950.
112. Huse, J.T., C. Brennan, D. Hambardzumyan, B. Wee, J. Pena, S.H. Rouhanifard, C. Sohn-Lee, C. le Sage, R. Agami, T. Tuschl, and E.C. Holland, *The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo*. *Genes Dev*, 2009. **23**(11): p. 1327-1337.
113. Smits, M., J. Nilsson, S.E. Mir, P.M. van der Stoop, E. Hulleman, J.M. Niers, P.C. de Witt Hamer, V.E. Marquez, J. Cloos, A.M. Krichevsky, D.P. Noske, B.A. Tannous, and T. Würdinger, *miR-101 is down-regulated in glioblastoma resulting in*

- EZH2-induced proliferation, migration, and angiogenesis*. *Oncotarget*, 2010. **1**(8): p. 710-720.
114. Smits, M., S.E. Mir, R.J. Nilsson, P.M. van der Stoop, J.M. Niers, V.E. Marquez, J. Cloos, X.O. Breakefield, A.M. Krichevsky, D.P. Noske, B.A. Tannous, and T. Würdinger, *Down-regulation of miR-101 in endothelial cells promotes blood vessel formation through reduced repression of EZH2*. *PLoS One*, 2011. **6**(1): p. e16282.
115. Shi, L., J. Chen, J. Yang, T. Pan, S. Zhang, and Z. Wang, *MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity*. *Brain Res*, 2010. **1352**: p. 255-264.
116. Yang, Y.N., X.H. Zhang, Y.M. Wang, X. Zhang, and Z. Gu, *miR-204 reverses temozolomide resistance and inhibits cancer initiating cells phenotypes by degrading FAP-alpha in glioblastoma*. *Oncol Lett*, 2018. **15**(5): p. 7563-7570.
117. Wang, H., S. Ren, Y. Xu, W. Miao, X. Huang, Z. Qu, J. Li, X. Liu, and P. Kong, *MicroRNA-195 reverses the resistance to temozolomide through targeting cyclin E1 in glioma cells*. *Anticancer Drugs*, 2019. **30**(1): p. 81-88.
118. Dweep, H. and N. Gretz, *miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions*. *Nat Methods*, 2015. **12**(8): p. 697.
119. Dweep, H., C. Sticht, P. Pandey, and N. Gretz, *miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes*. *J Biomed Inform*, 2011. **44**(5): p. 839-847.
120. Kreth, S., E. Limbeck, L.C. Hinske, S.V. Schutz, N. Thon, K. Hoefig, R. Egensperger, and F.W. Kreth, *In human glioblastomas transcript elongation by alternative polyadenylation and miRNA targeting is a potent mechanism of MGMT silencing*. *Acta Neuropathol*, 2013. **125**(5): p. 671-681.
121. Kushwaha, D., V. Ramakrishnan, K. Ng, T. Steed, T. Nguyen, D. Futalan, J.C. Akers, J. Sarkaria, T. Jiang, D. Chowdhury, B.S. Carter, and C.C. Chen, *A genome-wide miRNA screen revealed miR-603 as a MGMT-regulating miRNA in glioblastomas*. *Oncotarget*, 2014. **5**(12): p. 4026-4039.
122. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. *J Mol Biol*, 1983. **166**(4): p. 557-580.
123. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-408.
124. Quintavalle, C., D. Mangani, G. Roscigno, G. Romano, A. Diaz-Lagares, M. Iaboni, E. Donnarumma, D. Fiore, P. De Marinis, Y. Soini, M. Esteller, and G. Condorelli, *MiR-221/222 target the DNA methyltransferase MGMT in glioma cells*. *PLOS ONE*, 2013. **8**(9): p. e74466.
125. Pieper, R.O., S. Patel, S.A. Ting, B.W. Futscher, and J.F. Costello, *Methylation of CpG island transcription factor binding sites is unnecessary for aberrant silencing of the human MGMT gene*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(23): p. 13916-13924.
126. Happold, C., P. Roth, W. Wick, N. Schmidt, A.-M. Florea, M. Silginer, G. Reifenberger, and M. Weller, *Distinct molecular mechanisms of acquired resistance*

- to temozolomide in glioblastoma cells*. Journal of Neurochemistry, 2012. **122**(2): p. 444-455.
127. Hermisson, M., A. Klumpp, W. Wick, J. Wischhusen, G. Nagel, W. Roos, B. Kaina, and M. Weller, *O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells*. Journal of Neurochemistry, 2006. **96**(3): p. 766-776.
 128. Perazzoli, G., J. Prados, R. Ortiz, O. Caba, L. Cabeza, M. Berdasco, B. González, and C. Melguizo, *Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression*. PLOS ONE, 2015. **10**(10): p. e0140131.
 129. Lee, Y.Y., A.A. Yarmishyn, M.L. Wang, H.Y. Chen, S.H. Chiou, Y.P. Yang, C.F. Lin, P.I. Huang, Y.W. Chen, H.I. Ma, and M.T. Chen, *MicroRNA-142-3p is involved in regulation of MGMT expression in glioblastoma cells*. Cancer Manag Res, 2018. **10**: p. 775-785.
 130. Zhang, W., J. Zhang, K. Hoadley, D. Kushwaha, V. Ramakrishnan, S. Li, C. Kang, Y. You, C. Jiang, S.W. Song, T. Jiang, and C.C. Chen, *miR-181d: a predictive glioblastoma biomarker that downregulates MGMT expression*. Neuro Oncol, 2012. **14**(6): p. 712-719.
 131. Nie, E., X. Jin, W. Wu, T. Yu, X. Zhou, Z. Shi, J. Zhang, N. Liu, and Y. You, *MiR-198 enhances temozolomide sensitivity in glioblastoma by targeting MGMT*. J Neurooncol, 2017. **133**(1): p. 59-68.
 132. Gao, Y.T., X.B. Chen, and H.L. Liu, *Up-regulation of miR-370-3p restores glioblastoma multiforme sensitivity to temozolomide by influencing MGMT expression*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 32972.
 133. Thomson, D.W., C.P. Bracken, J.M. Szubert, and G.J. Goodall, *On measuring miRNAs after transient transfection of mimics or antisense inhibitors*. PLOS ONE, 2013. **8**(1): p. e55214-e55214.
 134. Chi, S.W., J.B. Zang, A. Mele, and R.B. Darnell, *Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps*. Nature, 2009. **460**(7254): p. 479-486.
 135. Lin, R.J., Y.C. Lin, and A.L. Yu, *miR-149* induces apoptosis by inhibiting Akt1 and E2F1 in human cancer cells*. Mol Carcinog, 2010. **49**(8): p. 719-727.
 136. Jin, H.Y., A. Gonzalez-Martin, A.V. Miletic, M. Lai, S. Knight, M. Sabouri-Ghomi, S.R. Head, M.S. Macauley, R.C. Rickert, and C. Xiao, *Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution*. Frontiers in genetics, 2015. **6**: p. 340-340.
 137. Didiano, D. and O. Hobert, *Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(9): p. 849-851.
 138. Kertesz, M., N. Iovino, U. Unnerstall, U. Gaul, and E. Segal, *The role of site accessibility in microRNA target recognition*. Nat Genet, 2007. **39**(10): p. 1278-1284.
 139. Sandberg, R., J.R. Neilson, A. Sarma, P.A. Sharp, and C.B. Burge, *Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites*. Science, 2008. **320**(5883): p. 1643-1647.

140. Mayr, C. and D.P. Bartel, *Widespread Shortening of 3'UTRs by Alternative Cleavage and Polyadenylation Activates Oncogenes in Cancer Cells*. *Cell*, 2009. **138**(4): p. 673-684.
141. Fan, S.J., H.B. Li, G. Cui, X.L. Kong, L.L. Sun, Y.Q. Zhao, Y.H. Li, and J. Zhou, *miRNA-149* promotes cell proliferation and suppresses apoptosis by mediating JunB in T-cell acute lymphoblastic leukemia*. *Leuk Res*, 2016. **41**: p. 62-70.
142. Takao, K., B. Joshua, K. Yasuko, K. Seiji, and M.G. Isabelle, *Inhibition of DNA repair for sensitizing resistant glioma cells to temozolomide*. *Journal of Neurosurgery*, 2003. **99**(6): p. 1047-1052.
143. Kanzawa, T., I.M. Germano, Y. Kondo, H. Ito, S. Kyo, and S. Kondo, *Inhibition of telomerase activity in malignant glioma cells correlates with their sensitivity to temozolomide*. *British Journal of Cancer*, 2003. **89**(5): p. 922-929.
144. Alonso, M.M., C. Gomez-Manzano, B.N. Bekele, W.K.A. Yung, and J. Fueyo, *Adenovirus-Based Strategies Overcome Temozolomide Resistance by Silencing the O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase Promoter*. *Cancer Research*, 2007. **67**(24): p. 11499.
145. Goellner, E.M., B. Grimme, A.R. Brown, Y.-C. Lin, X.-H. Wang, K.F. Sugrue, L. Mitchell, R.N. Trivedi, J.-b. Tang, and R.W. Sobol, *Overcoming Temozolomide Resistance in Glioblastoma via Dual Inhibition of NAD⁺ Biosynthesis and Base Excision Repair*. *Cancer Research*, 2011. **71**(6): p. 2308.
146. Medarova, Z., P. Pantazopoulos, and B. Yoo, *Screening of potential miRNA therapeutics for the prevention of multi-drug resistance in cancer cells*. *Scientific reports*, 2020. **10**(1): p. 1970-1970.
147. Yip, S., J. Miao, D.P. Cahill, A.J. Iafrate, K. Aldape, C.L. Nutt, and D.N. Louis, *MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance*. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2009. **15**(14): p. 4622-4629.
148. Roos, W.P., L.F.Z. Batista, S.C. Naumann, W. Wick, M. Weller, C.F.M. Menck, and B. Kaina, *Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O⁶-methylguanine*. *Oncogene*, 2007. **26**(2): p. 186-197.
149. Tang, K., Q. Jin, W. Yan, W. Zhang, G. You, Y. Liu, and T. Jiang, *Clinical correlation of MGMT protein expression and promoter methylation in Chinese glioblastoma patients*. *Med Oncol*, 2012. **29**(2): p. 1292-1296.
150. Silber, J.R., A. Blank, M.S. Bobola, B.A. Mueller, D.D. Kolstoe, G.A. Ojemann, and M.S. Berger, *Lack of the DNA repair protein O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in histologically normal brain adjacent to primary human brain tumors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996. **93**(14): p. 6941-6946.
151. Ishii, N., D. Maier, A. Merlo, M. Tada, Y. Sawamura, A.C. Diserens, and E.G. Van Meir, *Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines*. *Brain Pathol*, 1999. **9**(3): p. 469-479.
152. Patyka, M., Z. Sharifi, K. Petrecca, J. Mansure, B. Jean-Claude, and S. Sabri, *Sensitivity to PRIMA-1MET is associated with decreased MGMT in human*

- glioblastoma cells and glioblastoma stem cells irrespective of p53 status*. *Oncotarget*, 2016. **7**(37): p. 60245-60269.
153. St-Coeur, P.-D., J.J. Poitras, M. Cuperlovic-Culf, M. Touaibia, and P. Morin, Jr., *Investigating a signature of temozolomide resistance in GBM cell lines using metabolomics*. *Journal of Neuro-Oncology*, 2015. **125**(1): p. 91-102.
154. University of Manchester. *miRBASE*. [cited 2019; Available from: <http://www.mirbase.org>].
155. Jin, L., W.L. Hu, C.C. Jiang, J.X. Wang, C.C. Han, P. Chu, L.J. Zhang, R.F. Thorne, J. Wilmott, R.A. Scolyer, P. Hersey, X.D. Zhang, and M. Wu, *MicroRNA-149*, a p53-responsive microRNA, functions as an oncogenic regulator in human melanoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(38): p. 15840-15845.
156. Okato, A., T. Arai, Y. Yamada, S. Sugawara, K. Koshizuka, L. Fujimura, A. Kurozumi, M. Kato, S. Kojima, Y. Naya, T. Ichikawa, and N. Seki, *Dual Strands of Pre-miR-149 Inhibit Cancer Cell Migration and Invasion through Targeting FOXM1 in Renal Cell Carcinoma*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(9): p. 1-17.
157. Fogli, S., B. Polini, S. Carpi, B. Pardini, A. Naccarati, N. Dubbini, M. Lanza, M.C. Breschi, A. Romanini, and P. Nieri, *Identification of plasma microRNAs as new potential biomarkers with high diagnostic power in human cutaneous melanoma*. *Tumour Biol*, 2017. **39**(5): p. 1-8.
158. Li, Y., C. Liu, Y. Liao, W. Wang, B. Hu, X. Lu, and J. Cui, *Characterizing the landscape of peritoneal exosomal microRNAs in patients with ovarian cancer by high-throughput sequencing*. *Oncol Lett*, 2019. **17**(1): p. 539-547.
159. Ling, L., Y.D. Zhang, Z.Y. Chen, Y. Chen, and C.P. Ren, *The clinicopathological significance of miR-149 and PARP-2 in hepatocellular carcinoma and their roles in chemo/radiotherapy*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(9): p. 12339-12346.
160. Bellazzo, A. and L. Collavin, *A mechanism for cell non-autonomous inactivation of the tumor suppressor DAB2IP*. *Oncoscience*, 2018. **5**(5-6): p. 177-178.
161. Bellazzo, A., G. Di Minin, E. Valentino, D. Sicari, D. Torre, L. Marchionni, F. Serpi, M.B. Stadler, D. Taverna, G. Zuccolotto, I.M. Montagner, A. Rosato, F. Tonon, C. Zennaro, C. Agostinis, R. Bulla, M. Mano, G. Del Sal, and L. Collavin, *Cell-autonomous and cell non-autonomous downregulation of tumor suppressor DAB2IP by microRNA-149-3p promotes aggressiveness of cancer cells*. *Cell Death Differ*, 2018. **25**(7): p. 1224-1238.
162. Cao, D., Z. Jia, L. You, Y. Wu, Z. Hou, Y. Suo, H. Zhang, S. Wen, T. Tsukamoto, M. Oshima, J. Jiang, and X. Cao, *18beta-glycyrrhetic acid suppresses gastric cancer by activation of miR-149-3p-Wnt-1 signaling*. *Oncotarget*, 2016. **7**(44): p. 71960-71973.
163. Ma, M.H., J.X. An, C. Zhang, J. Liu, Y. Liang, C.D. Zhang, Z. Zhang, and D.Q. Dai, *ZEB1-AS1 initiates a miRNA-mediated ceRNA network to facilitate gastric cancer progression*. *Cancer Cell Int*, 2019. **19**: p. 27.
164. Ruan, Z., H. Deng, M. Liang, Z. Xu, M. Lai, H. Ren, X. Deng, and X. Su, *Downregulation of long non-coding RNA MAFG-AS1 represses tumorigenesis of colorectal cancer cells through the microRNA-149-3p-dependent inhibition of HOXB8*. *Cancer Cell Int*, 2020. **20**: p. 511.

165. Liu, D., M. Qiu, L. Jiang, and K. Liu, *Long Noncoding RNA HOXB-AS1 Is Upregulated in Endometrial Carcinoma and Sponged miR-149-3p to Upregulate Wnt10b*. *Technol Cancer Res Treat*, 2020. **19**: p. 1-10.
166. Long, C., L. Jiang, F. Wei, C. Ma, H. Zhou, S. Yang, X. Liu, and Z. Liu, *Integrated miRNA-mRNA analysis revealing the potential roles of miRNAs in chordomas*. *PLOS ONE*, 2013. **8**(6): p. e66676.
167. Yao, J. and X. Wu, *Upregulation Of miR-149-3p Suppresses Spinal Chordoma Malignancy By Targeting Smad3*. *OncoTargets and therapy*, 2019. **12**: p. 9987-9997.
168. Shin, C.H., H. Lee, H.R. Kim, K.H. Choi, J.G. Joung, and H.H. Kim, *Regulation of PLK1 through competition between hnRNPK, miR-149-3p and miR-193b-5p*. *Cell Death Differ*, 2017. **24**(11): p. 1861-1871.
169. Si, L., L. Xu, L. Yin, Y. Qi, X. Han, Y. Xu, Y. Zhao, K. Liu, and J. Peng, *Potent effects of dioscin against pancreatic cancer via miR-149-3P-mediated inhibition of the Akt1 signalling pathway*. *Br J Pharmacol*, 2017. **174**(7): p. 553-568.
170. Shen, Q., H. Zhu, Q. Lei, L. Chen, D. Yang, and W. Sui, *MicroRNA-149-3p inhibits cell proliferation by targeting AKT2 in oral squamous cell carcinoma*. *Mol Med Rep*, 2021. **23**(3): p. 1-11.
171. Wang, Y., J. Chen, M. Zhang, W. Zhang, M. Li, W. Zang, Z. Dong, and G. Zhao, *MiR-149 sensitizes esophageal cancer cell lines to cisplatin by targeting DNA polymerase β* . *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2018. **22**(8): p. 3857-3865.
172. Liu, Y., C. Yang, Y. Zhao, Q. Chi, Z. Wang, and B. Sun, *Overexpressed methyltransferase-like 1 (METTL1) increased chemosensitivity of colon cancer cells to cisplatin by regulating miR-149-3p/S100A4/p53 axis*. *Aging*, 2019. **11**: p. 12328-12344.
173. Yang, D., G. Du, A. Xu, X. Xi, and D. Li, *Expression of miR-149-3p inhibits proliferation, migration, and invasion of bladder cancer by targeting S100A4*. *Am J Cancer Res*, 2017. **7**(11): p. 2209-2219.
174. Ru, Q., X. Tian, M.S. Pi, L. Chen, K. Yue, Q. Xiong, B.M. Ma, and C.Y. Li, *Voltagegated K⁺ channel blocker quinidine inhibits proliferation and induces apoptosis by regulating expression of microRNAs in human glioma U87MG cells*. *Int J Oncol*, 2015. **46**(2): p. 833-840.

Danksagung

Zuerst bedanke ich mich bei Prof. Dr. Guido Reifenberger für die Ermöglichung und fortlaufende, wertschätzende Unterstützung meiner Dissertation, mit der ich meinen ersten Meilenstein in der Welt der Wissenschaft erreichen konnte.

Dann gilt mein sehr herzlicher Dank meinen Betreuern Dr. Marietta Wolter und Dr. Bastian Malzkorn für deren engmaschige, differenzierte und humorvolle Betreuung meiner Arbeit. Ihr habt mich sowohl dazu ermutigt, stets wissenschaftlich zu denken, als auch dabei, nicht den Spaß und Optimismus zu verlieren. Ich bin euch sehr dankbar für alles, was ihr mir gezeigt, erklärt und beigebracht habt.

Bei Prof. Dr. Michael Sabel bedanke ich mich für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Auch bedanke ich mich bei dem gesamten Institut für Neuropathologie für wertvolle Rückmeldungen bei den *Retreats* und für ein großartiges, kollegiales Arbeiten.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir dieses Studium und diese Promotion ermöglicht haben, die nie an mir gezweifelt haben und mir beigebracht haben, immer an mich selbst zu glauben.

Dann bedanke ich mich für die wichtige und herzliche Begleitung auf dem Weg zum Dokortitel bei meinem Bruder, bei meinen engsten Freunden und zu guter Letzt bei meiner größten Stütze, meinem Freund und Partner Dominik.