

Aus der Klinik für Anaesthesiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler

Die Bedeutung von 3'-UTR-Varianzen bei der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Elisabeth Limbeck
aus Regen

Jahr
2013

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Betreuer: Frau Priv. Doz. Dr. med. Dr. rer. physiol. Simone Kreth

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Vigo Heissmeyer

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2014

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Die Bedeutung von 3'-UTR-Varianzen bei der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

1. Ledderose C, Möhnle P, **Limbeck E**, Schütz S, Weis F, Rink J, Briegel J, Kreth S (2012) Corticosteroid resistance in sepsis is influenced by microRNA-124-induced downregulation of glucocorticoid receptor- α . Crit Care Med 40(10):2745-53 (Impact Factor 2012: 6,124)
2. Kreth S*, **Limbeck E***, Hinske LC, Schütz SV, Thon N, Hoefig K, Egensperger R, Kreth FW (2013) In human glioblastomas transcript elongation by alternative polyadenylation and miRNA targeting is a potent mechanism of MGMT silencing. Acta Neuropathol 125(5):671-81. doi: 10.1007/s00401-013-1081-1 (Impact Factor 2012: 9,734)
* geteilte Erstautorenschaft

München, den

Elisabeth Limbeck

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Biogenese und Funktion von microRNA-Molekülen.....	1
1.2. Beeinflussung von miRNA-Wirkungen durch 3'-UTR-Varianzen der Zielgene.....	2
1.2.1. Alternatives Spleißen.....	3
1.2.2. Alternative Polyadenylierung.....	3
1.3. Einfluss alternativen Spleißens auf die Kortikosteroid-Insuffizienz bei Sepsis.....	5
1.3.1. Zielsetzung 1.....	8
1.4. Einfluss alternativer Polyadenylierung auf die Chemoresistenz bei Glioblastomen.....	9
1.4.1. Zielsetzung 2.....	12
2. Material und Methoden	13
2.1. Material.....	13
2.1.1. Geräte.....	13
2.1.2. Chemikalien.....	14
2.1.3. Verbrauchsmaterialien.....	18
2.2. Medien und Puffer.....	18
2.2.1. Medien für molekular- und zellbiologisches Arbeiten.....	18
2.2.2. Puffer und Lösungen.....	20
2.3. Oligonukleotide.....	21
2.4. Antikörper.....	23
2.5. Studienteilnehmer und Ethikanträge.....	23
2.6. Zellbiologische Methoden.....	24
2.6.1. Kultivierung von Zellen.....	24
2.6.2. Gewinnung und Stimulation von T-Lymphozyten.....	25
2.7. Molekularbiologische Methoden.....	26
2.7.1. Klonierung von Vektorkonstrukten.....	26
2.7.1.1. Polymerase-Kettenreaktion mit genomischer DNA.....	26

2.7.1.2.	Ligation in pSC-B-amp/kan	27
2.7.1.3.	Ligation in psiCHECK-2, pmR-ZsGreen1 und pTRE-Tight	28
2.7.2.	Gerichtete Mutagenese	29
2.7.3.	Transiente Transfektion mittels Elektroporation	31
2.7.3.1.	Luciferase-Assay	31
2.7.3.2.	Transfektion für qPCR-Experimente	32
2.7.3.3.	Tet-Off-Genexpressionssystem	32
2.7.3.4.	MTT-Assay.....	32
2.7.3.5.	Bestimmung der Transfektionseffizienz	33
2.7.4.	RNA-Extraktion und DNase-Verdau	33
2.7.5.	cDNA-Synthese	34
2.7.6.	Quantifizierung der mRNA-Expression.....	34
2.7.7.	Quantifizierung der miRNA-Expression	35
2.7.8.	3'-RLM-RACE.....	36
2.8.	Proteinbiochemische Methoden.....	38
2.8.1.	Gewinnung von Proteingesamtextrakten und Bradford-Assay	38
2.8.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
2.8.3.	Westernblot und Immunodetektion	39
2.8.4.	Bestimmung der IL-2-Proteinproduktion	39
2.9.	Statistische und bioinformatische Analysen.....	40
3.	Ergebnisse und Diskussion	41
3.1.	Regulation der Expression der GR-Isoformen durch alternatives Spleißen und miRNA-Bindung im Krankheitsbild der Sepsis	41
3.1.1.	Untersuchung des Expressionsprofils der GR-Isoformen α und β in primären humanen T-Zellen	41
3.1.2.	Einfluss von GR β auf Hydrokortison-vermittelte Effekte in humanen T-Zellen	42
3.1.3.	MiRNA-vermittelte Regulation der GR α -Expression	44
3.1.4.	Untersuchung des Expressionsverhaltens von GR α , GR β und miRNA-124 in T-Zellen septischer Patienten	48
3.1.5.	Diskussion der Ergebnisse 1	49

3.2. Regulation der Expression von MGMT durch alternative Polyadenylierung und miRNA-Bindung bei Glioblastomen	52
3.2.1. Untersuchung des Expressionsprofils der MGMT-Transkriptvarianten in Glioblastomen.....	52
3.2.2. Einfluss der MGMT-Isoformen auf die mRNA-Stabilität und die Proteinexpression.....	54
3.2.3. MiRNA-vermittelte Regulation der langen MGMT-Transkriptvariante...	56
3.2.4. Einfluss von miRNAs auf die TMZ-Sensitivität von Gliomzellen	60
3.2.5. Diskussion der Ergebnisse 2	62
4. Zusammenfassung.....	64
5. Summary.....	65
6. Literaturverzeichnis	66
7. Abkürzungsverzeichnis	80
8. Abbildungsverzeichnis	82
9. Tabellenverzeichnis	84
10. Danksagung.....	85

1. Einleitung

1.1. Biogenese und Funktion von microRNA-Molekülen

MicroRNAs (miRNAs) sind kurze, nicht-kodierende RNA-Moleküle einer Länge von 21-24 Nukleotiden (nt). Sie regulieren die Genexpression, indem sie an komplementäre Erkennungssequenzen im 3'-untranslatierten Bereich (3'-UTR) spezifischer mRNAs binden und damit deren Degradation bzw. eine Inhibition deren Translation bewirken [82]. Im Menschen sind bislang mehr als 1000 konservierte miRNAs bekannt, wobei eine individuelle miRNA eine große Anzahl verschiedener Ziel-mRNAs beeinflussen kann. Man geht davon aus, dass etwa ein Drittel aller humanen Transkripte durch miRNAs reguliert wird [55].

Die Synthese von miRNAs in eukaryotischen Zellen ist in mehrere Prozessierungsschritte unterteilt (siehe Abb. 1): Im Zellkern transkribiert die RNA-Polymerase II eine primäre miRNA (pri-miRNA). Diese hat eine Größe von 200 nt bis zu mehreren Kilobasen und wird durch das Enzym Drosha, eine dsRNA-spezifische RNase III, in die Vorläufer-miRNA (prä-miRNA) gespalten. Die Vorläufer-miRNA ist ca. 60 nt groß, besitzt eine Haarnadelstruktur sowie einen 2 nt langen Überhang an ihrem 3'-Ende, der für den Transport in das Zytoplasma wichtig ist. Die Vorläufer-miRNA wird GTP-abhängig mittels Exportin-5 in das Zytoplasma transportiert. Im Zytoplasma erfolgt eine Hydrolyse des GTPs, wodurch die prä-miRNA freigesetzt und durch die Endoribonuklease Dicer geschnitten wird. Es entsteht eine reife ca. 21-24 nt lange miRNA in Form eines miRNA:miRNA*-Doppelstranges [82,9]. Der energetisch stabilere miRNA-Strang wird in den „RNA Induced Silencing Complex“ (RISC) integriert während der instabilere Strang degradiert wird [58,33]. RISC ist ein RNA-Protein-Komplex, der unter anderem aus RNA-Helikasen und den Proteinen Argonaute 2, Dicer und „trans-activation-responsive RNA binding protein“ (TRBP) besteht [76,75,15]. Die in den RISC gebundene reife miRNA bindet über Watson-Crick-Basenpaarung an den 3'-UTR der komplementären mRNA. Es handelt sich dabei um eine partielle Komplementarität von 2-8 Basen zwischen miRNA und Ziel-mRNA [56]. Je nach Grad der Komplementarität wird die Ziel-mRNA degradiert (vollständige Komplementarität) oder die Translation wird inhibiert (imperfekte Komplementarität) [9].

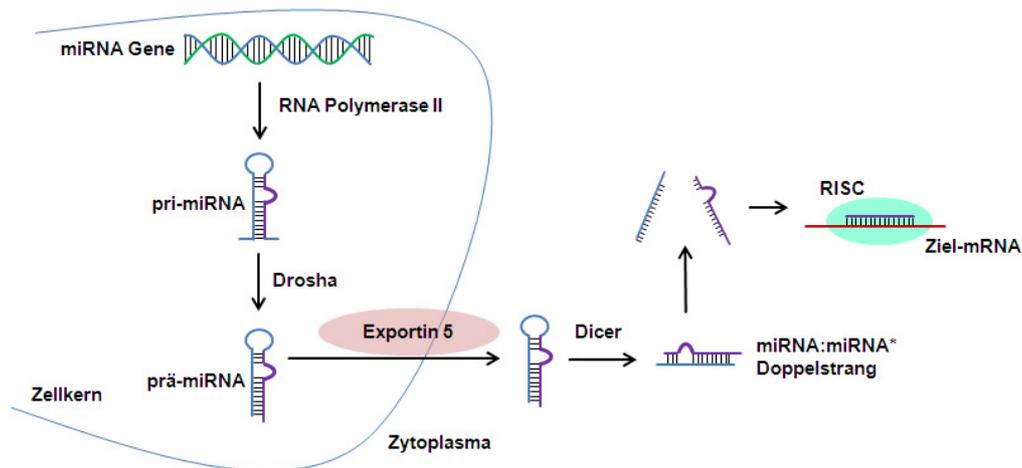


Abb. 1: Schematische Darstellung der miRNA-Prozessierung. Im Zellkern wird die pri-miRNA transkribiert und durch Drosha in die prä-miRNA prozessiert. Die prä-miRNA wird mittels Exportin in das Zytoplasma transportiert und durch Dicer enzymatisch in einen miRNA:miRNA*-Doppelstrang umgewandelt. Die reife miRNA wird in den RISC integriert und bindet an die komplementäre Ziel-mRNA.

1.2. Beeinflussung von miRNA-Wirkungen durch 3'-UTR-Varianzen der Zielgene

Eukaryotische mRNA-Moleküle sind aufgebaut aus einer 7-Methylguanosin-Gruppe am 5'-Ende, einem 5'-UTR, einer Protein-kodierenden Sequenz und einem 3'-UTR, der zwischen dem Stoppkodon und der Poly(A)-Sequenz am 3'-Terminus der mRNA lokalisiert ist (siehe Abb. 2) [62].



Abb. 2: Schematische Darstellung des Aufbaus von mRNAs. Eukaryotische mRNAs bestehen aus einem 5'-UTR mit einer Methylguanosin-Gruppe (m7GpppN) am 5'-Ende, einer Protein-kodierenden Sequenz (lokalisiert zwischen Start- und Stoppkodon) und einem 3'-UTR mit nachfolgender Poly(A)-Sequenz.

Es ist bekannt, dass die 3'-UTR-Länge verschiedener Transkripte von einigen Basen bis zu mehreren Kilobasen variiert. Die Auswirkungen unterschiedlicher 3'-UTR-Längen auf die mRNA- und Proteinexpression sind bislang nur wenig verstanden [99]. Neuere Studien zeigen, dass durch 3'-UTR-Varianzen die Wirkungen von miRNAs differenziell beeinflusst werden: Transkripte mit kürzerem 3'-UTR weisen weniger miRNA-Bindestellen auf, wodurch die mRNA-Stabilität und die Proteinexpression erhöht werden können [86,78]. Die 3'-UTR-Länge eines Gens

kann durch alternatives Spleißen oder alternative Polyadenylierung variiert werden [16,79,61,74].

1.2.1. Alternatives Spleißen

Die transkribierte prä-mRNA enthält neben den Protein-kodierenden Sequenzen reifer mRNA-Moleküle (Exons) auch Bereiche, welche nicht translatiert werden und durch Spleißen entfernt werden müssen (Introns). Dabei bindet ein sogenanntes Spleißosom, ein Komplex aus Ribonukleoproteinen, an spezifische Nukleotidsequenzen an den Enden der Introns, wodurch die prä-mRNA geschnitten wird, die Introns freigesetzt werden und die Exons miteinander verbunden werden [85].

Eine große Anzahl humaner Gene wird durch Verknüpfung verschiedener Exons alternativ gespleißt, wodurch mRNA-Isoformen mit unterschiedlicher Länge entstehen, die die mRNA-Stabilität sowie die Proteindiversität beeinflussen [40,11]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass 74% der alternativen Spleißvorgänge die Proteinexpression beeinflussen, 22% treten im 5'-UTR auf und nur 4% kommen im 3'-UTR vor, woraus sich folgern lässt, dass mehr Exons in Protein-kodierenden Bereichen vorhanden sind als in den UTRs [64]. Dennoch wurde in verschiedenen Untersuchungen gezeigt, dass alternatives Spleißen zu mRNA-Isoformen führt, die sich in der Länge ihrer exprimierten 3'-UTRs unterscheiden: Lupus erythematoses-Patienten exprimieren beispielsweise durch alternatives Spleißen ein verkürztes Transkript der Zeta-Kette des T-Zell-Rezeptors [16]. In humanen Lungenkarzinomzellen sowie in immortalisierten Keratinozyten führt alternatives Spleißen zu der Entstehung dreier Isoformen des Parathormon-verwandten Proteins (PTHrP) [79]. Die Expression alternativer 3'-UTR-Varianten nimmt dabei Einfluss auf die mRNA-Stabilität [79,16].

1.2.2. Alternative Polyadenylierung

Ein weiterer Prozessierungsmechanismus, der die 3'-UTR-Länge bestimmt, ist die Polyadenylierung. Im 3'-UTR der mRNA ist 10-30 Nukleotide vor der späteren

Spaltstelle ein Sequenzmotiv lokalisiert, das als Polyadenylierungssignal dient [18]. Das häufigste Sequenzmotiv ist „AAUAAA“. Bioinformatische Analysen konnten zeigen, dass auch andere Polyadenylierungssignale vorhanden sind, die sich von dem „AAUAAA“-Motiv jedoch nur um ein Nukleotid unterscheiden und seltener verwendet werden [29]. An das Polyadenylierungssignal lagert sich ein Multienzymkomplex an, der aus „cleavage and polyadenylation specificity factor“ (CPSF), „cleavage factors“ I_m und I_{lm} (CF I_m, CF I_{lm}), „cleavage stimulation factor“ (CstF) und Poly(A)-Polymerase besteht. Durch die Bindung des Proteinkomplexes an das Polyadenylierungssignal wird die prä-mRNA endonukleolytisch gespalten und es entsteht ein neues 3'-Hydroxy-Ende, an das in der folgenden Polyadenylierungsreaktion ein Poly(A)-Schwanz mit einer Länge von ca. 200-300 Adenylatresten angefügt wird [18].

Viele eukaryotische mRNAs enthalten alternative Polyadenylierungsstellen, die je nach Lokalisation die Genexpression differenziell beeinflussen: Alternative Polyadenylierungsstellen in Introns oder Exons können zu Veränderungen der kodierenden Sequenz der mRNA und dadurch zu einer Expression verschiedener Proteinisoformen führen. Die Lokalisation der Signale im 3'-UTR der mRNA ermöglicht die Entstehung von Transkriptvarianten mit unterschiedlicher 3'-UTR-Länge, die sich in ihrer Stabilität und Translationseffizienz unterscheiden können [23,24]. In verschiedenen humanen Krebszelllinien wurde gezeigt, dass durch alternative Polyadenylierung die mRNAs von IGF2BP1 („insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1“), Cyclin D1 und Cyclin D2 mit einem verkürzten 3'-UTR exprimiert werden. Die 3'-UTR-Verkürzung dieser mRNAs geht mit einer erhöhten Transkriptstabilität und einer gesteigerten Proteinexpression einher [61]. Eine alternative Polyadenylierung führt beispielsweise auch zur Expression von zwei Cyclooxygenase-2-Transkripten mit differenziellen 3'-UTR-Längen, wobei die kürzere mRNA-Variante eine erhöhte Stabilität aufweist [74].

In der vorliegenden Arbeit wurde an zwei Beispielen aus unterschiedlichen klinischen Bereichen untersucht, wie durch alternatives Spleißen und durch alternative Polyadenylierung die miRNA-vermittelte Regulation von Transkripten differenziell beeinflusst werden kann und welche klinischen Implikationen dies haben könnte.

1.3. Einfluss alternativen Spleißens auf die Kortikosteroid-Insuffizienz bei Sepsis

Die Sepsis ist eine komplexe systemische Immunreaktion, die durch eine Invasion pathogener Keime ausgelöst wird. Grundsätzlich ist diese Immunreaktion zur Keimabwehr notwendig, jedoch kommt es im klinischen Syndrom einer Sepsis zu pathologischen Entgleisungen: Sowohl eine massive Überaktivierung der Immunzellen als auch eine Immunsuppression treten auf, was zu lebensgefährlichen Organdysfunktionen mit einer Letalität bis zu 50% führt [21,31,98]. Als wesentliche Auslöser der Sepsis gelten Pathogen-assoziierte molekulare Muster, konservierte mikrobielle Strukturen, die von „Pattern-Recognition“-Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt werden [98,31]. Durch die Bindung der pathogenen Moleküle an die Rezeptoren werden diese aktiviert und es folgt eine Hochregulation co-stimulierender Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen sowie eine Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen [87]. Die initiale Phase der Sepsis ist mit einer Aktivierung von Typ 1 T-Helfer-Zellen (Th1) verbunden, wodurch verstärkt proinflammatorische Zytokine, wie Interleukin-2 (IL-2), Interferon γ (IFN γ) und Tumornekrosefaktor α (TNF α), sezerniert werden [38]. Im Verlauf der Sepsis wird die primäre hyperinflammatorische Antwort durch eine antiinflammatorische, immunsuppressive Phase abgelöst, die als „Compensatory Anti-inflammatory Response-Syndrom“ (CARS) bezeichnet wird. Diese Phase ist gekennzeichnet durch eine verminderte Expression proinflammatorischer Zytokine, eine verringerte Lymphozyten-Proliferation, eine reduzierte Aktivität von T-Zellen und Makrophagen sowie eine zunehmende Apoptoserate von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten [87,38,1]. In dieser Phase werden vermehrt Typ 2 T-Helfer-Zellen (Th2) aktiviert, die antiinflammatorische Zytokine (z. B. IL-4 und IL-10) freisetzen [38].

Als eine adjuvante Therapiemaßnahme bei Sepsis findet die niedrigdosierte Gabe von Hydrokortison häufig Verwendung [5,4]. Während eine Hochdosistherapie mit Glukokortikoiden aufgrund einer hohen Rate an Nebenwirkungen schon früh als kontraindiziert erkannt wurde, konnten für eine niedrigdosierte kontinuierliche Gabe von Hydrokortison in klinischen Studien günstige Effekte gefunden werden [83,14]. Die immunmodulatorischen Wirkungen von Hydrokortison sind vielfältig und nicht vollständig geklärt. Es ist jedoch anzunehmen, dass bei der niedrigdosierten Gabe von Glukokortikoiden genomische Effekte mit Wirkung über die Regulation der

Transkription inflammationsrelevanter Gene gegenüber den nicht-genomischen, rasch einsetzenden Wirkungen der Hochdosistherapie überwiegen [73].

Neben der Wirkung auf homöostatische Prozesse nehmen Glukokortikoide Einfluss auf das Immunsystem [60,17,96]. Sie inhibieren die Zytokinsekretion (IL-2, IL-6, IL-8, IL-4, IL-10, TNF α , IFN γ), die Proliferation von T-Helfer-Zellen (Th1 und Th2) und die Expression von Molekülen, die an Zell-Zell-Interaktionen und der Migration von T-Zellen beteiligt sind [13,26,19,6]. Die zellulären Wirkungen der Glukokortikoide werden durch die Bindung an den Glukokortikoidrezeptor (GR) vermittelt, einen Steroidhormonrezeptor, der zur Familie der nukleären Rezeptoren zählt [57].

Im Menschen wurden zwei verschiedene Spleißvarianten des GRs (α - und β -Form) beschrieben, die sich hauptsächlich durch die Expression verschieden langer 3'-UTR-Varianten unterscheiden (siehe Abb. 3).

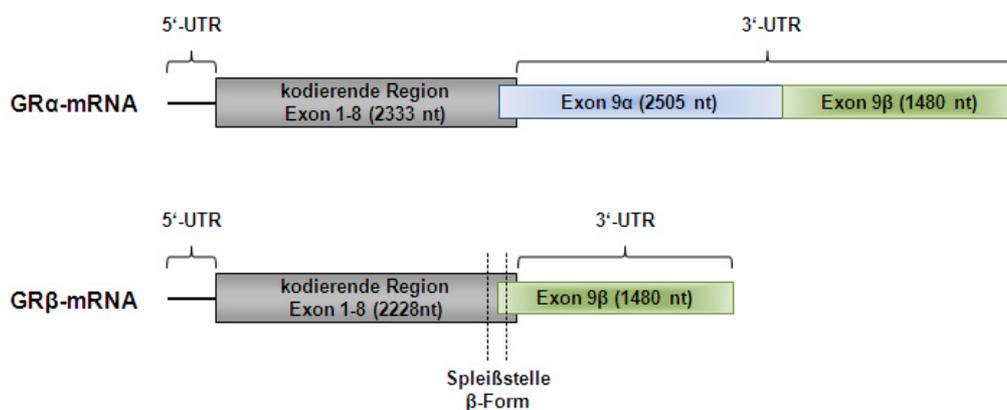


Abb. 3: Alternatives Spleißen führt zu zwei GR-Isoformen. GR α entsteht durch das Spleißen von Exon 8 mit Exon 9. Die GR α -mRNA besteht aus einer 2333 nt langen kodierenden Region und einem 3'-UTR von 3985 nt Länge. Bei GR β wird Exon 8 mit einer strangabwärts gelegenen Region von Exon 9 verknüpft, wodurch eine mRNA mit einer verkürzten kodierenden Region (2228 nt) und einem kürzeren 3'-UTR (1480 nt) entsteht.

GR α entsteht durch das Zusammenfügen von Exon 8 mit Exon 9 und exprimiert einen 3985 nt langen 3'-UTR. GR α kodiert für ein Protein von 777 Aminosäuren Länge, das mit hoher Affinität Glukokortikoide bindet und die immunsuppressiven und antiinflammatorischen Wirkungen vermittelt. Bei GR β wird Exon 8 mit strangabwärts gelegenen Bereichen von Exon 9 verknüpft, wodurch ein stark verkürzter 3'-UTR entsteht. Das GR β -Protein ist 35 Aminosäuren kürzer als das GR α -Protein, ist nicht zur Ligandenbindung befähigt und hat eine dominant negative Wirkung, d. h. es hemmt die Aktivität der α -Form [66,30,65]. In verschiedenen Tumorzelllinien (z. B. HeLa S3 und CEMC7) sowie in humanen neutrophilen

Granulozyten wurde gezeigt, dass GR β in wesentlich geringeren Mengen exprimiert wird als GR α [95,88,71,54].

In Zellen ist GR α im Zytoplasma lokalisiert und liegt als Multiproteinkomplex gebunden an Chaperone (z. B. Hsp90-Protein) vor. Nach der Diffusion der Glukokortikoide durch die Zellmembran binden diese an den GR α -Proteinkomplex. In Folge der Bindung kommt es zur Konformationsänderung von GR α , zur Dissoziation der Chaperone sowie zur nukleären Translokation des Rezeptors. Im Zellkern bilden sich aktive GR α -Dimere, die die Genexpression beeinflussen (siehe Abb. 4) [65,30]. Dabei wird unterschieden zwischen direkter und indirekter Regulation: Die direkte Regulation erfolgt durch die Bindung der Rezeptor-Dimere an „glucocorticoid response elements“ (GRE) bzw. „negative glucocorticoid response elements“ (nGRE), wodurch die Genexpression initiiert bzw. inhibiert wird. Bei der indirekten Regulation wird die Genexpression durch die Interaktion von GR α -Dimeren mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B (Nukleärer Faktor κ B), NFAT (Nukleärer Faktor von aktivierten T-Zellen) und AP-1 (Aktivatorprotein-1), beeinflusst [3,65]. Die Aktivität von GR α kann kompetitiv durch die β -Form gehemmt werden (siehe Abb. 4) [66].

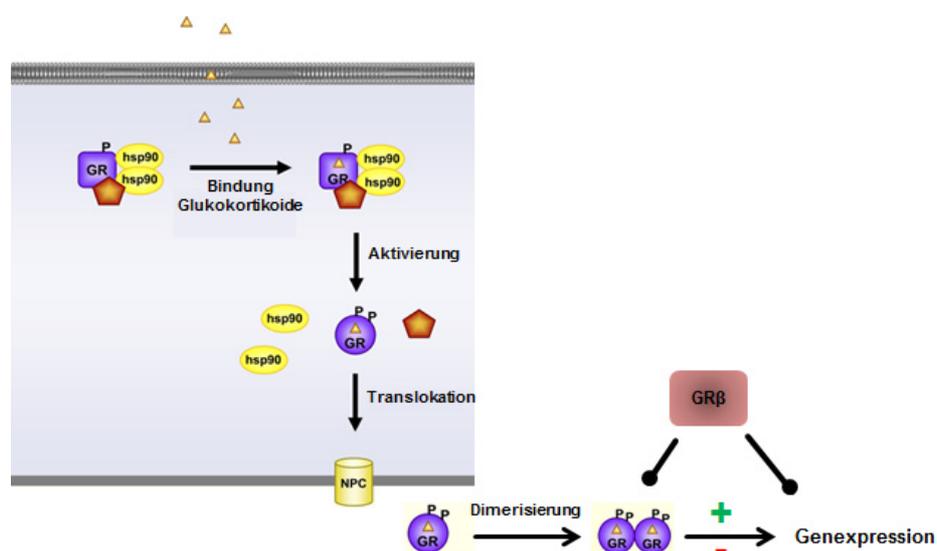


Abb. 4: Schematische Darstellung des GR-Signalweges (modifiziert nach [65]). GR α bindet im Zytoplasma Glukokortikoide, wodurch der Rezeptor aktiviert wird. Es kommt zur Konformationsänderung von GR α , zur Dissoziation von Hsp90 sowie zur Translokation in den Zellkern. GR α dimerisiert dort und reguliert die Expression von Zielgenen. Die Rezeptor-Dimerisierung und die Beeinflussung der Genexpression können durch die GR β -Form gehemmt werden.

Eine beträchtliche Anzahl von Sepsis-Patienten weist eine primäre oder nach Therapie erworbene Insensitivität auf Glukokortikoide auf, die sich auf den weiteren Verlauf der Erkrankung ungünstig auswirkt und deren Ursachen bislang nur unzureichend geklärt sind. Zur Bezeichnung dieses komplexen klinischen Syndroms wurde im Rahmen der Konsensuskonferenz des „American College of Chest Physicians“ und der „Society of Critical Care Medicine“ der Begriff „Critical illness-related corticosteroid insufficiency“ (CIRCI) eingeführt [59].

Mögliche molekulare Mechanismen, die zu der Entstehung einer primären Glukokortikoidresistenz beitragen, sind Mutationen, Deletionen und Polymorphismen in funktionell wichtigen Bereichen des GRs [41,37,91,77]. Die Mechanismen zur Entwicklung einer sekundären nach Therapie erworbenen Resistenz sind nicht geklärt und werden derzeit kontrovers diskutiert: Es wird vermutet, dass die Aktivität der α -Form durch eine gesteigerte GR β -Expression gehemmt wird und somit eine Insensitivität auf Glukokortikoide entstehen könnte [48,80]. Andere Arbeitsgruppen konnten die Beziehung zwischen GR β und Steroid-Insuffizienz nicht bestätigen, sodass dieser Mechanismus noch genauerer Aufklärung bedarf [32,90].

1.3.1. Zielsetzung 1

Die Rolle der GR-Isoformen GR α und GR β in humanen T-Zellen und der molekulare Mechanismus ihrer differentiellen Expression ist bislang ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit sollte sowohl das Expressionsprofil der GR-Spleißvarianten, als auch die Wirkung von GR β auf Hydrokortison-vermittelte Effekte in humanen T-Lymphozyten untersucht werden. Da sich beide Isoformen vorwiegend in ihrem 3'-UTR unterscheiden, wäre eine Spleißvarianten-spezifische Regulation durch miRNAs sowie eine daraus resultierende Entstehung einer Glukokortikoidresistenz denkbar. Diese Hypothese sollte in der vorliegenden Arbeit validiert werden.

1.4. Einfluss alternativer Polyadenylierung auf die Chemoresistenz bei Glioblastomen

Gliome sind intrakranielle Tumore astrozytären, oligodendroglialen oder ependymalen Ursprungs und machen rund 70% aller Hirntumore aus. Der häufigste und aggressivste maligne Gehirntumor, der zu der Gruppe der astrozytären Gliome zählt, ist das Glioblastom (GBM) [68]. GBM werden in zwei Gruppen unterteilt: Primäre GBM entstehen *de novo* ohne das Vorhandensein maligner Vorstufen, sekundäre GBM entstehen aus niedrig malignen Gliomen [72,70]. Die Inzidenz eines GBM wird mit 2-3 Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner pro Jahr angegeben, wobei geringfügig mehr Männer als Frauen an einem GBM erkranken [67]. Die klinische Prognose der GBM-Patienten bleibt trotz aggressiver multimodaler Behandlungsstrategien weiterhin sehr ungünstig: Die meisten Patienten sterben innerhalb eines Jahres nach Diagnosestellung, die fünf-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit beträgt weniger als 3% [69,68]. Hohe Proliferationsraten und frühzeitige diffuse Invasion einzelner Gliomzellen in das umgebende gesunde Hirngewebe sowie eine ausgeprägte Strahlen- und Chemotherapieresistenz der Tumorzellen sind wesentliche Ursachen für den fast immer letalen Ausgang der Erkrankung [97].

Der Einsatz von Temozolomid (TMZ) in Kombination mit einer Radiotherapie stellt den einzig relevanten Fortschritt dar, der in der Therapie von GBM bezüglich Progression und Überleben im letzten Jahrzehnt erzielt werden konnte. Es wurde gezeigt, dass eine konkomitante und adjuvante Chemotherapie mit TMZ, im Vergleich zu einer alleinigen Strahlentherapie, das mediane Überleben der GBM-Patienten um 2,5 Monate auf 14,6 Monate erhöhte [89].

TMZ ist ein alkylierendes Zytostatikum, das bei einem physiologischen pH-Wert spontan zu aktivem 3-Methyl-Triazen-1-yl-Imidazol-4-Carboxamid (MTIC) hydrolysiert wird. MTIC reagiert mit der DNA und führt zur Methylierung der O⁶- und N⁷-Positionen der Base Guanin. Aufgrund fehlerhafter Basenpaarungen generiert O⁶-Methylguanin Einzel- und Doppelstrangbrüche in der DNA und induziert dadurch apoptotische Signalwege [7,2]. So wurde in TMZ-behandelten U87MG-Gliomzellen eine erhöhte Expression der pro-apoptotischen Proteine Calpain, Caspase-3 und Bax (Bcl-2-assoziiertes Protein X) gefunden [20].

Das DNA-Reparaturenzym O^6 -Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) wird ubiquitär in humanen Zellen exprimiert und repariert DNA-Schäden, die durch mutagene Umwelteinflüsse oder endogene Stoffwechselprodukte entstehen [27,44]: Aktives MGMT erkennt O^6 -Methylguanin und spaltet die Methylgruppe an der O^6 -Position ab, wodurch natives Guanin wiederhergestellt wird und keine DNA-Strangbrüche mehr entstehen. In Folge der irreversiblen Bindung der freigesetzten Methylgruppe an Cysteinreste von MGMT wird das Enzym selbst inaktiviert, ubiquitinyliert und proteolytisch degradiert (siehe Abb. 5). Zur Aufrechterhaltung des zellulären Schutzmechanismus muss MGMT von den Zellen neu synthetisiert werden [35,84].

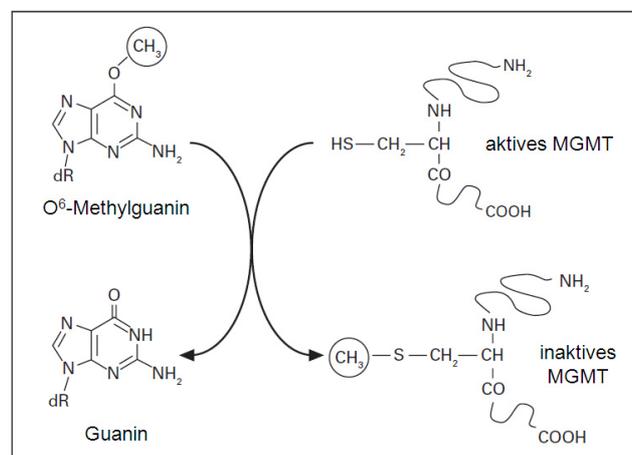


Abb. 5: DNA-Reparaturmechanismus von MGMT (modifiziert nach [35]). Aktives MGMT spaltet die Methylgruppe an der O^6 -Position von O^6 -Methylguanin ab und geht mit der freigesetzten Methylgruppe eine irreversible Bindung ein, wodurch MGMT inaktiviert wird.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass MGMT zytotoxische Effekte von Chemotherapeutika, wie TMZ, neutralisiert: So bilden beispielsweise MGMT-überexprimierende CHO („Chinese hamster ovary“)-Zellen Resistenzen gegenüber alkylierende Chemotherapeutika aus [45]. In humanen Tumorzelllinien führt die Inhibierung von MGMT zu einer erhöhten Sensitivität auf TMZ-Behandlung, d. h. die durch Chemotherapie entstandenen DNA-Schäden werden nach MGMT-Inhibierung nicht mehr repariert. Eine hohe MGMT-Expression in Tumorzellen geht somit mit einer schlechteren Ansprechrate der Zellen auf Chemotherapie einher [8].

Als prädiktiver molekularer Marker für die Effizienz einer Radio-/Chemotherapie mit TMZ wird der Nachweis der Methylierung des Promotors für *MGMT* verwendet. Eine Hypermethylierung der Cytosine in den Cytosin-phosphatidyl-Guanin (CpG)-Inseln

innerhalb des *MGMT*-Promotors führt zu einer Heterochromatisierung des *MGMT*-Gens und somit zu einer reduzierten *MGMT*-Expression [94]. Es ist bekannt, dass GBM-Patienten mit methyliertem *MGMT*-Promotor besser auf TMZ-Therapie ansprechen und eine verlängerte Überlebensrate aufweisen als Patienten mit unmethyliertem *MGMT*-Promotor (siehe Abb. 6) [34].

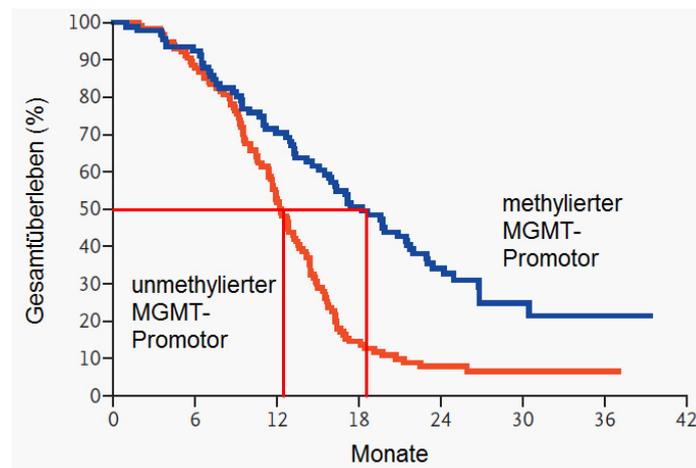


Abb. 6: Kaplan-Meier-Überlebenskurven von GBM-Patienten stratifiziert nach dem *MGMT*-Promotormethylierungsstatus (modifiziert nach [34]). Gezeigt ist das Überleben von GBM-Patienten, die mit TMZ in Kombination mit einer Radiotherapie behandelt wurden. Die Patienten wurden stratifiziert nach dem *MGMT*-Promotormethylierungsstatus. Medianes Überleben: unmethyliert: 12,2 Monate; methyliert: 18,2 Monate.

Neuere Studien deuten jedoch darauf hin, dass in etwa 30% der Fälle Diskrepanzen zwischen *MGMT*-Promotormethylierung und klinischem Verlauf auftreten [25]. Obwohl *MGMT*-Promotormethylierungsstatus und mRNA-Expression in der Regel negativ miteinander korreliert sind, wurden in ca. 20% der Fälle diskordante Ergebnisse gefunden: Es konnten Tumore mit methyliertem *MGMT*-Promotor und einer hohen *MGMT*-Expression sowie Tumore mit unmethyliertem *MGMT*-Promotor und einer niedrigen *MGMT*-Expression identifiziert werden. Dabei hatten GBM-Patienten, unabhängig vom Promotormethylierungsstatus, bei verringerter *MGMT*-Expression eine weitaus bessere Prognose. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei GBM-Patienten eine Therapieentscheidung zugunsten einer Chemotherapie nicht allein auf der Basis des *MGMT*-Promotormethylierungsstatus möglich ist und dass posttranskriptionelle Mechanismen vorhanden sein müssen, die zu einer weiteren Regulation der *MGMT*-Expression beitragen [51].

1.4.1. Zielsetzung 2

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden zwei - vermutlich durch alternative Polyadenylierung entstehende – MGMT-mRNA-Isoformen unterschiedlicher 3'-UTR-Länge identifiziert. Eine differenzielle Regulation der beiden MGMT-Transkriptvarianten durch miRNAs wäre somit denkbar. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welche MGMT-Isoformen in GBM exprimiert werden, ob miRNAs die MGMT-Expression beeinflussen und welche Rolle dies bei der Entstehung einer Chemoresistenz spielen könnte.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

AGFA Curix 60	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, B
Attune™ Acoustic Focusing Cytometer	Applied Biosystems, Foster City, USA
Brutschrank Function Line	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Feinwaage MP 300	Chyo Balance Corp., Kyoto, J
Gel Doc 2000	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Hera Safe Sterilbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Kompaktschüttler KS 15 Control mit Inkubationshaube	Edmund Buhler GmbH, Hechingen
Light Cycler 480	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Luminometer MicroLumat Plus	Berthold Technologie GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Microplate Reader MRX	Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, USA
Milli-Q Advantage A10 Water System	Merck Millipore, Billerica, USA
Mikroskop Modell IB	Optech Inc., Vaughan, CAN
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
NanoDrop ND-2000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Neon Transfection System	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Sub-Cell GT Elektrophorese System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Ultrazentrifuge TGA-50	Hemotec, Gellerkirchen, CH
Vacuum Manifold	Promega GmbH, Mannheim
Vi-Cell XR Cell Viability Analyzer	Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA

Wasserbad SWB 25
Zentrifuge 5415R
Zentrifuge Varifuge 3.0R

Haake Technik GmbH, Vreden
Eppendorf AG, Hamburg
Heraeus Holding GmbH, Hanau

2.1.2. Chemikalien

Acrylamid	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose Gel Loading Dye 6x	Amresco Inc., Solon, USA
Agarose Serva Tablets	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Attune™ Focusing Fluid	Applied Biosystems, Foster City, USA
Attune™ Wash Solution	Applied Biosystems, Foster City, USA
Attune™ 10x Shutdown Solution	Applied Biosystems, Foster City, USA
Attune™ Performance Beads	Applied Biosystems, Foster City, USA
autoMACS Rinsing Solution	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Bromphenolblau Electrophoresis Purity Reagent	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Bovines Serum Albumin (BSA) 100x	New England BioLabs Inc., Ipswich, USA
DMEM-Medium	Group Ltd, Basel, CH
DMEM-Medium (4,5 g/L Glucose)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
DNA Ladder 100 bp	Promega GmbH, Mannheim
DNA Ladder 1 kb	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Stratagene, La Jolla, USA
Doxycyclin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dual-Glo Luciferase Assay Sytem	Promega GmbH, Mannheim
DY-547-labeled siGLO RISC-Free Control siRNA	Dharmacon Inc., Lafayette, USA

Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28 for cell expansion and activation	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Cy3 dye-labeled Pre-miR Negative Control	Applied Biosystems, Foster City, USA
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 100% für Molekularbiologie	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Fötale Bovines Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin
FirstChoice RLM-RACE Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Geneticin	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycin	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Hank'sche Lösung ohne Phenolrot (HBSS)	Apotheke Innenstadt Universität München
Hefeextrakt Servabacteria pulverförmig	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Hepes	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Histopaque 1077	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hydrokortison	Pfizer Pharma GmbH, Berlin
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycinsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
L-Glutamin 200 mM	Biochrom AG, Berlin
LightCycler 480 Probes Master	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LumiGLO® Reagent and 20X Peroxide	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA
MACS BSA Stock Solution	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Magermilchpulver	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
mirVana miRNA Isolation Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumpyruvat	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Non-essential amino acids (NEAA)	Biochrom AG, Berlin
Neon Transfection System 10 µl Kit	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Neon Transfection System 100 µl Kit	Invitrogen GmbH, Darmstadt
New England Puffer 2 (10x)	New England BioLabs Inc., Ipswich, USA
New England Puffer 3 (10x)	New England BioLabs Inc., Ipswich, USA
Oligo-dT Primer	Invitrogen GmbH, Darmstadt
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pan T Cell Isolation Kit II, human	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Apotheke Innenstadt Universität München
PCR-Grade Nuklease-freies Wasser	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Penicillin-Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
PfuUltra II Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
PfuUltra II Reaktionspuffer 10x	Stratagene, La Jolla, USA
pmR-ZsGreen1 Vektor	Clontech Laboratories Inc., Mountain View, USA
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pre-miR miRNA Precursor Molecules	Applied Biosystems, Foster City, USA
Pre-miR miRNA Precursor Negative Control #1	Applied Biosystems, Foster City, USA
Protease Inhibitor Cocktail Set 1	Merck KGaA, Darmstadt
psiCHECK™-2 Vektor	Promega GmbH, Mannheim
Pure Yield Plasmid Midiprep System	Promega GmbH, Mannheim
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep Miniprep	Qiagen GmbH, Hilden
QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Random Hexamers	Invitrogen GmbH, Darmstadt

Real Time Ready Single Assay IL-2 (Assay 100958)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Restriktionsenzyme	New England BioLabs Inc., Ipswich, USA
RNAqueos Micro Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
RPMI-1640 Medium	Lonza Group Ltd, Basel, CH
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
siRNA gegen Glukokortikoidrezeptor β - Form	Dharmacon Inc., Lafayette, USA
StrataClone Ultra Blunt PCR Cloning Kit	Stratagene, La Jolla, USA
SuperScript III Reverse Transcriptase Kit	Invitrogen GmbH, Darmstadt
T4 DNA Ligase	Promega GmbH, Mannheim
T4 DNA Ligase Puffer	Promega GmbH, Mannheim
TaqMan MicroRNA Assay	Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
TRIS-Borat-EDTA (TBE)-Puffer 5x Temed	Amresco Inc., Solon, USA
Temodal (Temozolomid)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Tet-Off® Advanced Inducible Gene Expression System	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tet System Approved FBS	Clontech Laboratories Inc., Mountain View, USA
Tris-HCl	Clontech Laboratories Inc., Mountain View, USA
Trypsin/EDTA Solution	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Trypton	Biochrom AG, Berlin
Turbo DNA-Free Kit	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tween-20	Applied Biosystems, Foster City, USA
UPL-Sonde	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Zellyse Puffer (10x)	Promega GmbH, Mannheim
	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

Filterpapier für Blot	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Immobilon Transfermembran	Merck Millipore, Billerica, USA
Röntgenfilm	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, B
Plastikwaren	Beckman Coulter, Fullerton, USA
	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
	Berthold Technologie GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
	Eppendorf AG, Hamburg
	Falcon, Heidelberg
	Invitrogen GmbH, Darmstadt
	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
	TPP AG, Trasadingen, CH

2.2. Medien und Puffer

2.2.1. Medien für molekular- und zellbiologisches Arbeiten

Vor Gebrauch wurde FCS 30 min bei 56°C erwärmt, um vorhandene Komplementfaktoren zu inaktivieren.

A549- und Jurkat-Medium:

- RPMI-Medium
- 10% FCS (hitzeinaktiviert)
- 1% L-Glutamin
- 1% Penicillin-Streptomycin
- 1% Natriumpyruvat

HEK- und U87-Medium:

DMEM-Medium
10% FCS (hitzeinaktiviert)
1% L-Glutamin
1% Penicillin-Streptomycin
1% NEAA

HEK-Tet-Off-Medium:

HEK-und U87-Medium
10% Tet System Approved FCS (hitzeinaktiviert)
100 µg/mL Geneticin

LB-Medium:

10 g Trypton
10 g Natriumchlorid
5 g Hefeextrakt
→ in 1 Liter H₂O_{dd} gelöst und autoklaviert

LB-Agar:

1 Liter LB-Medium mit 15 g Agar

Stripping Puffer:

15 g Glycin
1 g SDS
10 mL Tween 20
→ in 1 Liter H₂O_{dd} gelöst

T98G-Medium:

DMEM-Medium (4,5 g/L Glucose)
10% FCS (hitzeinaktiviert)
1% L-Glutamin
1% Penicillin-Streptomycin
1% NEAA

2.2.2. Puffer und Lösungen

Lämmli-Probenpuffer (5x):

0,5 M Tris-HCl pH 6,8
45% Glycerol
10% SDS
12,5% β -Mercaptoethanol
0,25% Bromphenolblau

MTT-Zellysepuffer:

9,94 mL DMSO
0,06 mL Essigsäure
1 g SDS

PBS-T:

PBS mit 0,1% Tween-20

Puffer A:

1:20-Verdünnung von MACS BSA Stock Solution
mit autoMACS Rinsing Solution

Sammelgelpuffer:

1 M Tris pH 6.8 mit HCl einstellen

SDS-Laufpuffer (10x):

250 mM Tris
1,92 M Glycin
1% SDS

Transferpuffer (10X):

250 mM Tris
1,92 M Glycin

Trenngelpuffer:

1,5 M Tris pH 8.8 mit HCl einstellen

2.3. Oligonukleotide

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Metabion (Martinsried) synthetisiert.

Tabelle 1: Verwendete Primer

<i>Klonierung</i>	
GR α For	5' gtttaaacattccccgagatgtagctg 3'
GR α Rev	5' aagcaccaaccattttcac 3'
MGMT 3'-UTR For	5' NNNNNgtttaaacgggaggagctcaggtct 3'
MGMT 3'-UTR Rev	5' tggcaggtaggaaacaaagc3'
miRNA-124 For	5' agatctgtgtgctgtaaatggcatgg 3'
miRNA-124 Rev	5' ctgcagacaggcgggaactactgct 3'
<i>Mutagenese</i> (mutierte Basen sind unterstrichen)	
GR α -mut-1,2 For	5' gtgactgcggttaataagaatggttg <u>c</u> actaaagaaagtcg 3'
GR α -mut-1,2 Rev	5' cgactttctttag <u>t</u> gcaaccattcttattaccgcagtcac 3'
GR α -mut-3 For	5' cagaaaaggggaagttg <u>a</u> gcttttatagctattactgtctgg 3'
GR α -mut-3 Rev	5' ccagacagtaatagctataaaag <u>t</u> acaacttcccttctg 3'
MGMT mut For	5' ctgggaacaagcg <u>g</u> ccgccccttctgtttcc 3'
MGMT mut Rev	5' ggaaacagaaagggcg <u>g</u> ccgctgttcccag 3'
MGMT mut 181 For	5' cttctggctgtgtccata <u>a</u> actgtgatggcattctcc 3'
MGMT mut 181 Rev	5' gaaggaccgacacaggtat <u>t</u> gacactaccgtaagagg 3'
MGMT mut 648 For	5' atcccaggccgtcca <u>a</u> gctagaaagctggccc 3'
MGMT mut 648 Rev	5' tagggtccggcaggt <u>c</u> gatcttccgaccggg 3'
MGMT mut 767 For	5' gccatggcagtcagtgcttacc <u>a</u> aggtttctagctttgtt 3'
MGMT mut 767 Rev	5' cggtagcgtcagtcacgaatg <u>t</u> tccaaaagatcgaaacaaa 3'
<i>3'-RLM-RACE</i>	
3'-RACE-Adapter	5' gagcacagaattaatacgcactcactataggttttttttttt 3'
3'-RACE äußerer Primer	5' gcgagcacagaattaatacgcact 3'

3'-RACE innerer Primer	5' cgcgatccgaattaatacactactatagg 3'
MGMT 3' kurz For	5' gtgatttcttaccagcaattagca 3'
qPCR	
GR α For GR α Rev	5' agccattgtcaagaggggaag 3' 5' agcaatagttaaggagattttcaacc 3' UPL-Sonde #19
GR β For GR β Rev	5' agccattgtcaagaggggaag 3' 5' gctttctggtttaaccacataac 3' UPL-Sonde #19
MGMT 3' kurz For MGMT 3' kurz Rev	5' gtgatttcttaccagcaattagca 3' 5' ctgctgcagaccactctgtg 3' UPL-Sonde #52
MGMT 3' lang For MGMT 3' lang Rev	5' aggccgtccacactagaaag 3' 5' cacagccatggacacagc 3' UPL-Sonde #43
Rluc For Rluc Rev	5' aacaccgagttcgtgaaggt 3' 5' cattcatctggagcgtcct 3' UPL-Sonde #41
SDHA For SDHA Rev	5' gaggcagggtttaatacagca 3' 5' ccagttgtcctcctccatgt 3' UPL-Sonde #132
TBP For TBP Rev	5' gaggcagggtttaatacagca 3' 5' atagggattccgggagtcac 3' UPL-Sonde #87

Die siRNA gegen die Glukokortikoidrezeptor β -Form wurde anhand folgender Oligonukleotide von Dharmacon synthetisiert:

Tabelle 2: Verwendete siRNA gegen GR β

siRNA GRβ	
Sense	gcaugaaaauguuauuguguu
Antisense	5'-P-ccacauaacauuuuauuguu

2.4. Antikörper

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörperverdünnungen wurden mit 1% Magermilch in PBS-T hergestellt.

Tabelle 3: Verwendete Erst- und Zweitantikörper für Westernblot-Analysen

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Quelle
<i>Erstantikörper</i>			
β-Aktin	Maus	1:60000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glukokortikoid- rezeptor α	Kaninchen	1:1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
MGMT	Maus	1:500	Gene Tex Inc., Irvine, USA
<i>Zweitantikörper</i>			
Kaninchen-HRP	Ziege	1:2000	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA
Maus-HRP	Pferd	1:10000 (β-Aktin) 1:1000 (MGMT)	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA

2.5. Studienteilnehmer und Ethikanträge

Blutproben wurden von Patienten mit schwerer Sepsis oder mit septischem Schock entnommen (diagnostiziert nach: „American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine consensus conference“ [12]). Ausschlusskriterien waren vorbestehende oder aktuelle Kortikosteroidtherapien sowie maligne Erkrankungen. Als Kontrollgruppe dienten gesunde Freiwillige. Das Studienprotokoll wurde von den Ethikkommissionen der Ludwig-Maximilians-Universität München (No.107-11) sowie der Friedrich-Schiller-Universität Jena (No.2007-004333-42, Amendment für Klinikum der Universität München 2242-03/08) genehmigt. Blutproben zur T-Zell-Gewinnung (siehe 2.6.2.) wurden ausschließlich erst nach Erhalt der schriftlichen Einverständniserklärung von Sepsis-Patienten und von gesunden Probanden entnommen.

GBM-Gewebeproben wurden im Rahmen der klinischen Behandlung von erwachsenen Patienten mittels stereotaktischem Biopsie-Verfahren entnommen. Patienten, die bereits operative Eingriffe, Strahlentherapie und/oder Chemotherapie erhielten, wurden von der Studie ausgeschlossen. Alle GBM-Patienten gaben vor der Biopsat-Gewinnung eine schriftliche Einverständniserklärung ab. Für das Studienprotokoll liegt von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München (AZ 216/14) eine Genehmigung vor.

2.6. Zellbiologische Methoden

2.6.1. Kultivierung von Zellen

Die Durchführung aller Arbeitsmethoden erfolgte ausschließlich unter einer Umluft-Sterilbank (Heraeus). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen, -schalen oder -platten (Falcon, Sarstedt) in einem zellspezifischen Medium im Brutschrank bei 5% CO₂ und 37°C kultiviert.

Tabelle 4: Verwendete Zellen und Zelllinien

Zellen	Beschreibung	Referenz	Kulturmedium (siehe 2.2.1.)
A549	humane kanzerogene Alveolarepithelzellen; adhärenente Zellen	ATCC (#CCL-185)	Jurkat- und A549-Medium
HEK-293	humane embryonale Nierenzellen; adhärenente Zellen	ATCC (#CCL-1573)	HEK- und U87-Medium
HEK-293-Tet-Off-Advanced	stabile HEK-293-Zellen; exprimieren Transaktivatoren, die an TRE-spezifische Promotoren binden	Clontech (#631152)	HEK-Tet-Off-Medium

Jurkat-T-Zellen	humane leukämische T-Zellen; Suspensionszellen	ATCC (#TIB-152)	Jurkat- und A549-Medium
T98G	humane Gliomzellen; adhärente Zellen	ATCC (#CRL-1690)	T98G-Medium
T-Lymphozyten	kultiviert nach T-Zell-Gewinnung (siehe 2.6.2.); Suspensionszellen	humane Primärkultur	Jurkat- und A549-Medium
U87MG	humane Gliomzellen; adhärente Zellen	ATCC (#HTB-14)	HEK- und U87-Medium

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte am Vi-Cell XR Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter) durch eine Trypanblau-Färbung. Für die Durchführung weiterer Versuche wurde nur die Anzahl lebender Zellen berücksichtigt.

2.6.2. Gewinnung und Stimulation von T-Lymphozyten

Humane primäre T-Zellen wurden mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus jeweils 30 mL EDTA-Blut (EDTA-Röhrchen: Sarstedt) gewonnen. Dazu wurden in Plastikröhrchen (Falcon, Sarstedt) 3 mL Ficoll-Histopaque-Lösung (Sigma-Aldrich) mit 3 mL Blut überschichtet und für 15 min bei 1800 x g zentrifugiert. Die Lymphozyten-reiche Interphase wurde in ein neues Röhrchen überführt und zweimal mit HBSS gewaschen. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurde das Zellpellet in Puffer A (4 $\mu\text{L}/10^6$ Zellen) und Biotin-gekoppeltem Antikörper-Cocktail (1 $\mu\text{L}/10^6$ Zellen; Miltenyi) gelöst und für zehn min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden zu der Zellsuspension Puffer A (3 $\mu\text{L}/10^6$ Zellen) und anti-Biotin-MicroBeads (2 $\mu\text{L}/10^6$ Zellen; Miltenyi) gegeben. Nach einer Inkubation von 15 min bei 4°C wurde die Zellsuspension mit Puffer A gewaschen, in 500 μL Puffer A aufgenommen und zur magnetischen Separation auf eine sterile Magnetsäule (Miltenyi) pipettiert. Dabei wurden die mit Beads gekoppelten Zellen an die Säulen gebunden und die gewünschte Pan-T-Zell-Population wurde mittels negativer Selektion isoliert. Die T-Lymphozyten wurden mit Puffer A gewaschen und anschließend gezählt.

T-Zellen ($1 \cdot 10^6$ /mL) wurden mit 25 μ L anti-CD3/CD28-Dynabeads (Invitrogen) stimuliert und für 24 Stunden im Brutschrank bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden T-Lymphozyten mit 2 μ g/mL Hydrokortison (Pfizer Pharma) behandelt, woraus sich eine freie Hydrokortison-Konzentration von umgerechnet 30 μ g/dL im Medium ergibt. Diese Konzentration ist vergleichbar mit den Serumspiegeln Hydrokortison-behandelter Sepsis-Patienten [14,46].

2.7. Molekularbiologische Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde RNA und DNA mit Nuklease-freiem Wasser eluiert. Die Bestimmung der RNA- und DNA-Konzentration erfolgte am NanoDrop ND-2000 (Pepqab).

2.7.1. Klonierung von Vektorkonstrukten

2.7.1.1. Polymerase-Kettenreaktion mit genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus dem Blut gesunder Probanden unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits und nach Angaben des Herstellers (Qiagen) isoliert.

Die isolierte genomische DNA wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und unter Verwendung der in Tabelle 1 aufgeführten Klonierungs-Primer amplifiziert: Der GR α -3'-UTR wurde mit den Primern GR α For und Rev amplifiziert. Zur Herstellung des miRNA-Expressionsplasmides pmr-124 wurde mit den Primern miRNA-124 For und Rev ein 599 bp langes DNA-Fragment vervielfältigt, das die prä-miRNA Sequenz von miRNA-124 umschließt. Die lange 3'-UTR-Variante von MGMT wurde mittels der Primer MGMT 3'-UTR For und Rev amplifiziert.

Alle PCRs wurden unter Verwendung des StrataClone Ultra Blunt PCR Cloning Kits (Stratagene) und folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

2,5 µL	10x <i>Pfu</i> Ultra II Reaction Buffer
0,5 µL	dNTPs (25 mM je dNTP)
1,0 µL	genomische DNA (100 ng/µl)
1,0 µL	Primer For (10 µM)
1,0 µL	Primer Rev (10 µM)
1,0 µL	<i>Pfu</i> Ultra II fusion HS DNA-Polymerase
18,0 µL	Nuklease-freies Wasser

Die Amplifikation erfolgte im Mastercycler Gradient (Eppendorf) unter folgenden Reaktionsbedingungen:

- 1) Initiale Denaturierung: 95°C: 5 min
- 2) 36 Zyklen:
 - 95°C: 30 s
 - 60°C: 30 s
 - 72°C: 30 s
- 3) Finale Elongation: 72°C: 5 min

Die PCR-Produkte wurden mit 6x Ladepuffer (Amresco) versetzt und in einem Agarosegel (1% in 1x TBE-Puffer) bei 120 V für 40 min aufgetrennt. Die Banden wurden im UV Gel-Dokumentations System (Bio-Rad) detektiert. Die Ermittlung der Fragmentgrößen erfolgte anhand eines DNA-Molekulargewichtsmarkers (100 bp: Promega bzw. 1 kb: Thermo Scientific).

2.7.1.2. Ligation in pSC-B-amp/kan

Zur Ligation des PCR-Produktes (siehe 2.7.1.1.) in den Topoisomerase-Vektor pSC-B-amp/kan (StrataClone Ultra Blunt PCR Cloning Kit, Stratagene) wurden 2 µL des entstandenen Amplifikats mit 3 µL Strata Clone Blunt Cloning Buffer und 1 µL Strata Clone Blunt Vector Mix amp/kan gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der ligierte Vektor wurde anschließend mittels Hitzeschock in kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien (StrataClone SoloPack Competent Cells, *E. coli* K12 Stamm, Stratagene) transformiert.

Die Plasmidisolierung erfolgte unter Verwendung des QiaPrep Mini Kits (Qiagen) oder des PureYield™ Plasmid Midiprep Systems (Promega).

In der vorliegenden Arbeit wurden Plasmide mittels folgenden Reaktionsansatzes und einer einstündigen Inkubation im Wasserbad bei 37°C verdaut:

5 µL	10x NEBuffer
0,5 µL	100x BSA
1 µL	Restriktionsenzym 1 (10 U/µL)
1 µL	Restriktionsenzym 2 (10 U/µL)
1 µg	DNA
x µL	Nuklease-freies Wasser (bis Endvolumen: 50 µl)

Die 3'-UTRs wurden unter Verwendung der Restriktionsenzyme *PmeI* und *NotI* in den Reportervektor psiCHECK-2 (Promega) integriert. Zur Herstellung des Vektorkonstruktes psiCHECK-MGMT-3'-UTR kurz wurde nach erfolgter Mutagenese (siehe 2.7.2.) psiCHECK-MGMT-3'-UTR lang mit dem Restriktionsenzym *NotI* verdaut. Die Klonierung des miRNA-Expressionsplasmides erfolgte unter Verwendung der Restriktionsenzyme *BglII* und *PstI*. Zur Durchführung von Tet-Off-Experimenten wurden die jeweiligen MGMT-3'-UTR-Varianten sowie der kodierende Bereich des *Renilla*-Luciferase (Rluc)-Gens mittels den Restriktionsenzymen *NheI* und *NotI* aus den psiCHECK-Reporterplasmiden isoliert.

Nach dem Restriktionsverdau wurde die DNA im Agarosegel aufgetrennt, für eine weitere Ligation aus dem Gel präpariert und mit Hilfe des Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up Systems (Promega) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.7.1.3. Ligation in psiCHECK-2, pmR-ZsGreen1 und pTRE-Tight

Zur Ligation der geschnittenen DNA-Fragmente (siehe 2.7.1.2.) in psiCHECK-2, pmR-ZsGreen1 und pTRE-Tight wurde folgender Ansatz verwendet:

1 µL	T4 Ligase (Promega)
1 µL	T4 Ligase-Puffer (Promega)
50 ng	Plasmid
150 ng	DNA

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Plasmide generiert:

- psiCHECK-GR α -3'-UTR
- psiCHECK-MGMT-3'-UTR lang
- pmR-ZsGreen1-miRNA-124 (pmr-124)
- pTRE-Tight-MGMT-3'-UTR lang bzw. kurz

Nach einer Inkubation von vier Stunden bei Raumtemperatur wurde der Ligationsansatz in *E. coli* transformiert und auf Ampicillin-haltigen (psiCHECK-2, pTRE-Tight) bzw. Kanamycin-haltigen (pmR-ZsGreen1) Agarplatten ausplattiert. Die Plasmide wurden aus *E. coli* präpariert und von MWG (Ebersberg) sequenziert.

2.7.2. Gerichtete Mutagenese

Unter Verwendung des QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene) und den in Tabelle 1 aufgeführten Mutagenese-Primern wurden potenzielle miRNA-Bindestellen im 3'-UTR von GR α oder MGMT mutiert bzw. eine *NotI*-Restriktionsstelle in dem langen MGMT-3'-UTR eingefügt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

5 µL	10x Reaktionspuffer
80 ng	Plasmid
125 ng	Mutagenese-Primer For
125 ng	Mutagenese-Primer Rev
1 µL	dNTPs
1,5 µL	QuikSolution Reagenz
1 µL	QuickChange Lightning Enzym
x µL	Nuklease-freies Wasser (bis Endvolumen: 50 µl)

Bei der Mutagenese der ersten und zweiten miRNA-124-Bindestellen im GR α -3'-UTR wurden die Primer GR α -mut-1,2 For und Rev verwendet. Die dritte miRNA-124-Bindestelle im GR α -3'-UTR wurde mit Hilfe der Primer GR α -mut-3 For und Rev mutiert. Die Mutationen der Bindestellen für miRNA-181d, miRNA-648 und miRNA-767-3p im MGMT-3'-UTR wurden unter Verwendung der Primer MGMT mut 181 For und Rev, MGMT mut 648 For und Rev und MGMT mut 767 For und Rev durchgeführt. Zur Herstellung des kurzen MGMT-3'-UTR-Reporterkonstruktes (psiCHECK-MGMT-3'-UTR kurz) wurde mittels der Primer MGMT mut For und Rev eine *NotI*-Restriktionsstelle strangabwärts der ersten kanonischen Polyadenylierungssequenz eingefügt.

Für die Amplifikation im Thermocycler wurden folgende Reaktionsbedingungen verwendet:

- 1) Initiale Denaturierung: 95°C: 2 min
- 2) 18 Zyklen:
 - 95°C: 20 s
 - 60°C: 10 s
 - 68°C: 3 min, 8 s
- 3) Finale Elongation: 68°C: 5 min

Nach der Amplifikation wurden die Plasmide für 15 min bei 37°C mit 2 μ L *DpnI* behandelt. Das Enzym *DpnI* erkennt die Methylierungen des parentalen Plasmides und fragmentiert diesen, wodurch nur noch Plasmide mit mutierten Bindestellen im Reaktionsansatz vorhanden sind. Die mutierten Plasmide wurden anschließend mittels Hitzeschock in XL 10-Gold[®] UltraCompetent Cells (*E. coli* K12 Stamm, Stratagene) transformiert. Zur Bestätigung der Mutation in den miRNA-Bindestellen wurden die Plasmide aus *E. coli* präpariert und sequenziert (MWG, Ebersberg).

2.7.3. Transiente Transfektion mittels Elektroporation

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transfektionen wurden unter Verwendung des Neon Transfection Systems (Invitrogen) und folgender Elektroporationsparameter durchgeführt:

Tabelle 5: Verwendete Elektroporationsparameter

Zellen	Volt [V]	Zeit [ms]	Stromimpulse
10 µL-Transfektionsspitze			
HEK-293	1150	20	2
HEK-293-Tet-Off-Advanced	1150	20	2
T98G	1050	40	1
U87MG	1300	30	1
100 µL-Transfektionsspitze			
A549	1230	30	2
Jurkat-T-Zellen	1300	30	3
Primäre T-Zellen	2100	20	1
U87MG	1300	30	1

Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach Transfektion mit der 10 µL-Transfektionsspitze bzw. der 100 µL-Transfektionsspitze in 1 mL bzw. 2 mL Kulturmedium ohne Antibiotikum.

2.7.3.1. Luciferase-Assay

Zur Bestimmung der Reporteraktivität wurden HEK-293-Zellen oder U87MG-Zellen verwendet. $1 \cdot 10^5$ Zellen wurden mit 1 µg Wildtyp- bzw. mutiertem Reporterplasmid und mit 50 nM der entsprechenden premiR-Moleküle (Pre-miR miRNA Precursor Molecule, Applied Biosystems) co-transfiziert. Alternativ wurden 1 µg Reporterplasmid mit 1 µg pmr-124 bzw. pmr-Leervektor co-transfiziert. Nach erfolgter Elektroporation mittels einer 10 µL-Transfektionsspitze wurden die Zellen 40 Stunden inkubiert. Zur Bestimmung der Aktivität der Reportergene *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase wurde das Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) nach Angaben

des Herstellers und das Luminometer MicroLumat Plus (Berthold Technologie) verwendet. Die relative Luciferaseaktivität wurde durch Normalisierung der *Renilla*-Luciferaseaktivität auf die *Firefly*-Luciferaseaktivität ermittelt.

2.7.3.2. Transfektion für qPCR-Experimente

Zur Untersuchung der Veränderung der mRNA-Expression eines bestimmten Zielgenes wurden $2 \cdot 10^6$ Zellen mit 50 nM der entsprechenden premiR bzw. premiR-Negativkontrolle, oder mit 50 nM siRNA bzw. siRNA-Negativkontrolle (Dharmacon) in einem Volumen von 100 μ L transfiziert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen für 24 Stunden inkubiert.

2.7.3.3. Tet-Off-Genexpressionssystem

Zur Durchführung von Tet-Off-Experimenten wurden $1 \cdot 10^6$ HEK-293-Tet-Off-Advanced-Zellen transient mit 10 μ g pTRE-Tight-MGMT-3'UTR lang bzw. kurz und 10 μ g pTRE-Tight-*Firefly*-Luciferaseplasmid co-transfiziert. pTRE-Tight-*Firefly*-Luciferase diente dabei als Kontrolle der Transfektionseffizienz. Die Zellen wurden anschließend für 30 Stunden inkubiert. Zur Bestimmung der Stabilität der MGMT-3'-UTR-Varianten wurden die Zellen mit 3 μ g/mL Doxycyclin behandelt. Doxycyclin bindet an die Transaktivatoren, welche stabil von den HEK-293-Tet-Off-Advanced-Zellen exprimiert werden, und verhindert somit die Transkription der klonierten Gene. Die Zellen wurden acht Stunden bzw. 30 Stunden nach Doxycyclin-Zugabe geerntet und die Menge der noch vorhandenen Rluc-Transkripte wurde mittels qPCR (siehe 2.7.6.) bzw. Reporteragenassay (siehe 2.7.3.1.) untersucht.

2.7.3.4. MTT-Assay

Für die Untersuchung der Zellviabilität und des Zellwachstums mittels MTT-Assay (MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) wurden $4 \cdot 10^4$ T98G-Zellen mit 50 nM der entsprechenden premiR-Moleküle bzw. mit einer premiR-

Negativkontrolle transfiziert. In MTT-Versuchen wurden auch drei premiR-Moleküle gleichzeitig mit einer Konzentration von jeweils 20 nM eingesetzt.

Die transfizierten Zellen wurden für 12 Stunden inkubiert und anschließend für weitere 12 Stunden mit 100 μ M bzw. 500 μ M Temozolomid (TMZ; Sigma-Aldrich) oder DMSO (Sigma-Aldrich) behandelt. Zur Bestimmung der Zellviabilität mittels MTT-Assay wurde pro well 100 μ L MTT-Lösung (5 mg/mL in PBS, Sigma-Aldrich) zugegeben. Das gelb gefärbte MTT wird durch mitochondriale Dehydrogenasen zu intensiv violett gefärbtem Formazan umgewandelt. Nach einer Stunde Inkubation wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 100 μ L Zellysepuffer lysiert und die optische Dichte spektrophotometrisch bei 550 nm in einem Microplate Reader MRX (Dynatech Laboratories) ermittelt.

2.7.3.5. Bestimmung der Transfektionseffizienz

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden $2 \cdot 10^6$ Zellen mit 50 nM Cy3 dye-labeled Pre-miR Negative Control (Applied Biosystems) oder 50 nM DY-547-labeled siGLO RISC-Free Control siRNA (Dharmacon) transfiziert. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und zweimal in PBS gewaschen. Das Fluoreszenzsignal wurde im Attune Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems) unter Verwendung des 488 nm Lasers und eines 575 nm/24 nm Emissionsfilters (Cy3 und DY-547) detektiert. Die Auswertung erfolgte mittels der Attune Cytometric Software Version 1.2 (Applied Biosystems).

2.7.4. RNA-Extraktion und DNase-Verdau

RNA wurde mit dem mirVana miRNA Isolation Kit (Applied Biosystems) oder dem RNAqueos Micro Kit (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers extrahiert und einem DNase-Verdau (Turbo DNA-Free Kit, Applied Biosystems) unterzogen. Dafür wurde die eluierte RNA mit 1x DNase-Puffer und 1 μ L Turbo-DNase gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde „DNase Inactivation“-Reagenz hinzugegeben, zwei min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 16000 x g

für 90 s zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 0,5 mL-Eppendorfgefäß überführt.

2.7.5. cDNA-Synthese

Unter Verwendung des SuperScript III Reverse Transcriptase Kits (Invitrogen) wurde RNA in eine komplementäre copy-DNA (cDNA) revers transkribiert. Dabei wurde eine RNA-Verdünnung von 1 µg RNA in 10 µL Nuklease-freiem Wasser hergestellt. Zu der Verdünnung wurden 1 µL Oligo-dT Primer (50 µM; Invitrogen), 1 µL Random Hexamers (50 ng/µL; Invitrogen) und 1 µL dNTPs (100 mM) pipettiert. Der Ansatz wurde im Thermocycler für fünf min bei 65°C inkubiert und auf 4°C gekühlt. Anschließend wurden zu dem Reaktionsansatz 4 µL First-Strand-Buffer (5x), 1 µL Dithiothreitol (0,1 M), 1 µL RNase-Out (40 U/µL) und 1 µL Super Script Reverse Transkriptase (200 U/µL) pipettiert. Die cDNA-Synthese erfolgte im Thermocycler mit folgenden Reaktionsbedingungen:

- 1) 25°C: 5 min
- 2) 50°C: 45 min
- 3) 70°C: 15 min

2.7.6. Quantifizierung der mRNA-Expression

Die relative Quantifizierung der mRNA-Expression wurde in Doppelbestimmungen mittels der in Tabelle 1 aufgeführten qPCR-Primer sowie der „Housekeeping“-Gene SDHA und TBP durchgeführt [50,53]. Dafür wurde pro well 10 ng cDNA mit 4,4 µL Nuklease-freiem Wasser, 10 µL LightCycler 480 Probes Master (Roche), 0,2 µL Primer For (20 µM), 0,2 µL Primer Rev (20 µM) und 0,2 µL UPL-Sonde gemischt. Alternativ wurde die cDNA mit 4 µL Nuklease-freiem Wasser, 10 µL LightCycler 480 Probes Master und 1 µL Real Time Ready Single Assay IL-2 (Assay 100958, Roche) versetzt.

Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Reaktionsbedingungen:

- 1) Initiale Denaturierung: 95°C: 10 min
- 2) 50 Zyklen:
 - 95°C: 10 s
 - 60°C: 30 s
 - 72°C: 1 s
- 3) 40°C: 30 s

2.7.7. Quantifizierung der miRNA-Expression

Für die Quantifizierung der miRNA-Expression wurde RNA mit Hilfe des TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems) in cDNA umgeschrieben. Dabei wurde eine Verdünnung von 5 ng RNA in 2,5 µL Nuklease-freiem Wasser hergestellt und mit nachfolgenden Reagenzien versetzt:

- 0,075 µL dNTPs (100 mM)
- 0,5 µL MultiScribe-Reverse-Transcriptase (50 U/µl)
- 0,75 µL 10x Reverse Transcription Buffer
- 0,095 µL RNase-Inhibitor (20 U/µl)
- 0,58 µL Nuklease-freies Wasser
- 1,5 µL RT-Primer (TaqMan MicroRNA Assay, Applied Biosystems)
- 1,5 µL RT-Primer RNU6B (TaqMan MicroRNA Assay, Applied Biosystems)

Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis, wurde die RNA unter folgenden Bedingungen im Thermocycler amplifiziert:

- 1) 16°C: 30 min
- 2) 42°C: 30 min
- 3) 85°C: 5 min

Die relative Quantifizierung der miRNA-Expression erfolgte in Doppelbestimmungen und unter Normalisierung auf die endogene Kontrolle RNU6B. Dafür wurden 1,33 μL cDNA mit 7,67 μL Nuklease-freiem Wasser, 10 μL LightCycler 480 Probes Master (Roche) und 1 μL der jeweiligen TM-Primer (TaqMan MicroRNA Assay, Applied Biosystems) gemischt. Die Amplifikation erfolgte im LightCycler 480 und unter nachfolgenden Reaktionsbedingungen:

- 1) 95°C: 10 min
- 2) 50 Zyklen:
 - 95°C: 15 s
 - 60°C: 1 min
- 3) 40°C: 30 s

2.7.8. 3'-RLM-RACE

Zur Untersuchung der verschiedenen MGMT-3'-UTR-Varianten wurde eine 3'-RLM-RACE („RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends“) unter Verwendung des FirstChoice RLM-RACE Kits (Applied Biosystems) durchgeführt. Dazu wurde 1 μg RNA in cDNA revers transkribiert und mit den in Tabelle 1 aufgeführten Primern amplifiziert.

Die cDNA-Synthese erfolgte mittels folgenden Reaktionsansatzes, der für eine Stunde bei 42°C im Thermocycler inkubiert wurde:

2 μL	RNA (1 μg)
4 μL	dNTPs
2 μL	3'-RACE-Adapter
2 μL	10x Puffer
1 μL	RNase-Inhibitor
1 μL	M-MLV-Reverse-Transkriptase
8 μL	Nuklease-freies Wasser

Anschließend wurde eine äußere 3'-RLM-RACE-PCR durchgeführt. Dazu wurde folgender PCR-Ansatz hergestellt:

1 µL	cDNA
5 µL	10x Pfu Ultra 10x Buffer (StrataClone Ultra Blunt PCR Cloning Kit)
4 µL	dNTPs
2 µL	MGMT 3' kurz For (10 µM)
2 µL	3'-RACE äußerer Primer
0,5 µL	Pfu II Ultra-Polymerase (StrataClone Ultra Blunt PCR Cloning Kit)
35,5 µL	Nuklease-freies Wasser

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler unter folgenden Reaktionsbedingungen:

- 1) Initiale Denaturierung: 95°C: 3 min
- 2) 40 Zyklen:
 - 95°C: 30 s
 - 60°C: 30 s
 - 72°C: 90 s
- 3) Finale Elongation: 72°C: 7 min

Mit den entstandenen Amplifikaten wurde wie folgt eine innere 3'-RLM-RACE durchgeführt und die Amplifikation erfolgte analog zur äußeren 3'-RLM-RACE:

1 µL	Produkt der äußeren 3'-RACE-PCR
5 µL	10x Pfu Ultra 10x Buffer (StrataClone Ultra Blunt PCR Cloning Kit)
4 µL	dNTPs
2 µL	MGMT 3' kurz For (10 µM)
2 µL	3'-RACE innerer Primer
0,5 µL	Pfu II Ultra-Polymerase (StrataClone Ultra Blunt PCR Cloning Kit)
35,5 µL	Nuklease-freies Wasser

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert, aus dem Gel extrahiert und in pSC-B-amp/kan kloniert. Die Sequenz der klonierten MGMT-3'-UTR-Varianten wurde von MWG (Ebersberg) bestimmt.

2.8. Proteinbiochemische Methoden

2.8.1. Gewinnung von Proteingestamtextrakten und Bradford-Assay

Zur Gewinnung von Proteingestamtextrakten wurden Zellen geerntet, einmal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 500 μL 1x Zelllysepuffer (Cell Signaling) mit Protease Inhibitor Cocktail (Protease Inhibitor Cocktail Set 1, Merck) resuspendiert, für fünf min auf Eis inkubiert und für 30 s gevortext. Nach einer weiteren Inkubation von fünf min auf Eis wurde für 10 min bei 16000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL-Röhrchen überführt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bio-Rad Protein Assay-Reagenz (Bio-Rad) und einer BSA-Standardgeraden (4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 und 0 mg/mL). 4 μL Proteinextrakt bzw. BSA-Standard wurden mit 1x Reagenz versetzt, gevortext und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte mit 4 μL Probe und Doppelbestimmungen am NanoDrop bei einer optischen Dichte von 595 nm.

2.8.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt.

30 μg Proteinextrakt wurden mit Lämmli-Probenpuffer (5x) versetzt und nach kurzem Aufkochen bei 95°C in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard diente der PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Alle in der Arbeit verwendeten Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen in einem 10%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde für zwei Stunden bei 25 mA pro Gel und 300 V durchgeführt.

2.8.3. Westernblot und Immunodetektion

Nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte unter Verwendung der Mini Trans-Blot Cell-Apparatur ein Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Immobilon Transfermembran, Merck). Dazu wurde die Membran vor Gebrauch für 15 min in Methanol inkubiert. Anschließend wurden ein Schwamm, ein Whatman-Filterpapier, die Membran, das Gel und nochmal ein Whatman-Filterpapier und ein Schwamm in 1x Transfer-Puffer äquilibriert und in oben genannter Reihenfolge in die Blotting-Apparatur gegeben. Die Apparatur wurde mit 1x Transfer-Puffer gefüllt und der Transfer erfolgte bei 300 mA und 25 V pro Gel für zwei Stunden. Die Transfereffizienz wurde mittels einer reversiblen PonceauS-Färbung ermittelt.

Unspezifische Bindestellen auf der Membran wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5% Magermilch in PBS-T geblockt und die Membran wurde mit den Erstantikörpern (siehe Tabelle 3) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Membran mit 1% Magermilch in PBS-T für je 15 min, erfolgte eine Inkubation mit den Zweitantikörpern (siehe Tabelle 3) für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Die Membran wurde anschließend drei Mal für je zehn min in PBS-T gewaschen.

Die Detektion immunreaktiver Banden erfolgte mittels LumiGlo-Reagenz und 20x Peroxide (Cell Signaling) in einer 1:5-Verdünnung. Nach Auflegung eines Röntgenfilms (Agfa-Gevaert) wurde dieser in der Entwicklermaschine AGFA Curix 60 (Agfa-Gevaert) entwickelt. Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

2.8.4. Bestimmung der IL-2-Proteinproduktion

Primäre T-Zellen wurden mit 50 nM siRNA gegen GR β bzw. einer Negativkontrolle transfiziert und für 24 Stunden mit anti-CD3/CD28-Beads in Anwesenheit von Hydrokortison stimuliert. Die IL-2-Proteinexpression in den Zellüberständen wurde mittels Luminex-Technologie (Immumed, München) bestimmt.

2.9. Statistische und bioinformatische Analysen

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Daten mit Hilfe der Software SigmaPlot 11.0 (Systat Software GmbH) ausgewertet. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde unter Verwendung von T-Test und Mann-Whitney U-Test überprüft. Korrelationen wurden mittels Berechnung der Rangkorrelation nach Spearman ermittelt. Die statistische Signifikanz wurde folgendermaßen definiert: $P < 0,05$: signifikant; $P \leq 0,001$: hochsignifikant. Alle in der Arbeit durchgeführten Versuche wurden mindestens in Triplikaten durchgeführt und als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) oder als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt.

Potenzielle miRNA-Bindestellen wurden mit Hilfe von vier Vorhersageprogrammen (TargetScan, PITA, RNA22 und miRDB) *in silico* identifiziert [43,55,63,93].

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Regulation der Expression der GR-Isoformen durch alternatives Spleißen und miRNA-Bindung im Krankheitsbild der Sepsis

3.1.1. Untersuchung des Expressionsprofils der GR-Isoformen α und β in primären humanen T-Zellen

Es wird diskutiert, dass bei der Entstehung einer Glukokortikoid-Insuffizienz eine Imbalance in der Expression von GR α und GR β eine wichtige Rolle spielt [48,80]. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Sensitivität humaner T-Lymphozyten auf Glukokortikoide durch die GR-Isoformen beeinflusst wird und welche molekularen Mechanismen zu einer Imbalance in der Expression von GR α und GR β führen können.

Die Untersuchung des Expressionsmusters von GR α und GR β in unstimulierten humanen T-Zellen zeigte bei GR α eine mittlere relative mRNA-Expression von 1,50 und einen mittleren CP-Wert von 26,92. Bei GR β wurden eine mittlere relative mRNA-Expression von $3,40 \cdot 10^{-4}$ und ein mittlerer CP-Wert von 35,00 gefunden (siehe Tabelle 6). Die Ergebnisse zeigen, dass in primären humanen T-Zellen wesentlich geringere Mengen GR β als GR α exprimiert werden.

Tabelle 6: CP-Wert und relative mRNA-Expression von GR α und GR β in unstimulierten T-Zellen (Mittelwert \pm SD, n = 3)

	CP-Wert	Relative mRNA-Expression
GR α	26,92 \pm 0,41	1,50 \pm 0,35
GR β	35,00 \pm 0,06	$3,40 \cdot 10^{-4} \pm 1,00 \cdot 10^{-4}$

Es wurde nun untersucht, wie sich eine T-Zell-Rezeptor-spezifische Stimulation auf die Expression von GR α und GR β auswirkt. Nach Stimulation der T-Zellen mit anti-CD3/CD28-Beads wurde im Vergleich zu nativen T-Lymphozyten eine 1,6-fache (\pm 0,3) Zunahme der GR α -Expression gefunden. Eine gleichzeitige Inkubation der Zellen mit 30 μ g/dL Hydrokortison verringerte die GR α -mRNA-

Expression signifikant (siehe Abb. 7a). Dies wurde auch in Westerblot-Analysen bestätigt (siehe Abb. 7b). GR β zeigte im gleichen Versuchsansatz keine signifikanten Expressionsänderungen, weder nach Stimulation noch nach Hydrokortison-Behandlung (siehe Abb. 7a).

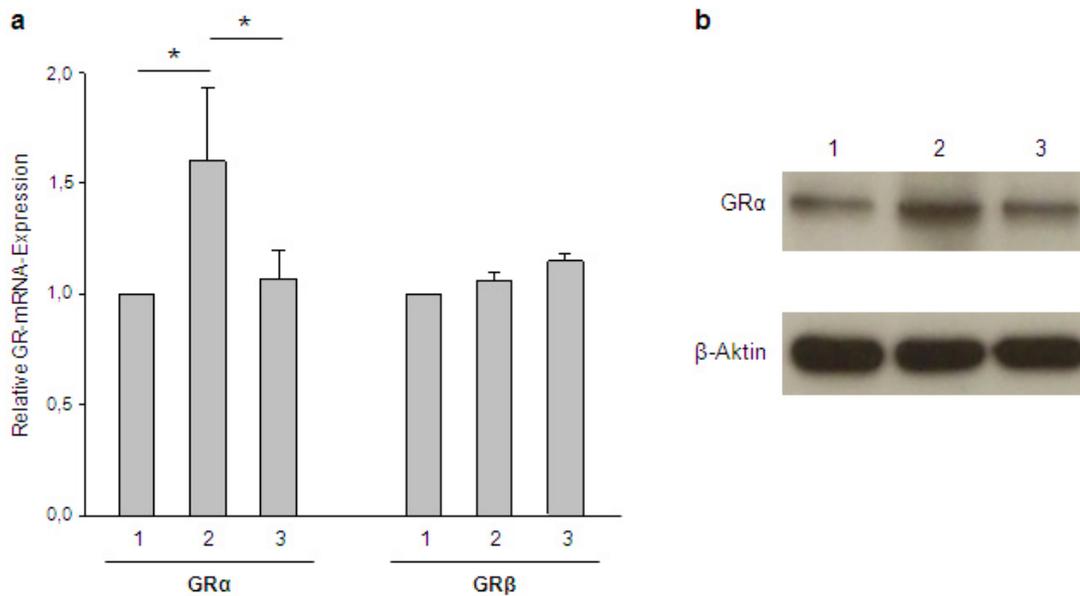


Abb. 7: Expression von GR α und GR β in nativen, stimulierten und Hydrokortison-behandelten humanen T-Zellen. a) RNA wurde aus primären T-Zellen gesunder Freiwilliger gewonnen und die Expression von GR α und GR β wurde in 1: nativen T-Zellen, 2: CD3/CD28-stimulierten T-Zellen und 3: CD3/CD28-stimulierten und Hydrokortison-behandelten T-Zellen untersucht. Die mRNA-Expression wurde mittels qPCR bestimmt und die Ergebnisse wurden relativ zu nativen T-Zellen dargestellt. Mittelwert \pm SD, n = 15, * P < 0,05. b) T-Zellen eines gesunden Probanden wurden 1: nicht stimuliert, 2: mit anti-CD3/CD28-Beads stimuliert und 3: stimuliert und mit Hydrokortison behandelt. Gesamtproteinextrakte wurden gewonnen und der GR α -Proteingehalt wurde mittels Westernblot-Analyse detektiert. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von vier unabhängigen Experimenten.

3.1.2. Einfluss von GR β auf Hydrokortison-vermittelte Effekte in humanen T-Zellen

Um zu untersuchen, ob GR β trotz der geringen Expression die Glukokortikoid-Wirkung in humanen T-Zellen reguliert, wurde ein siRNA-vermittelter Knockdown von GR β durchgeführt. Die Transfektionseffizienz von primären T-Lymphozyten mit siRNA-Molekülen betrug dabei ca. 50% (siehe Abb. 8).

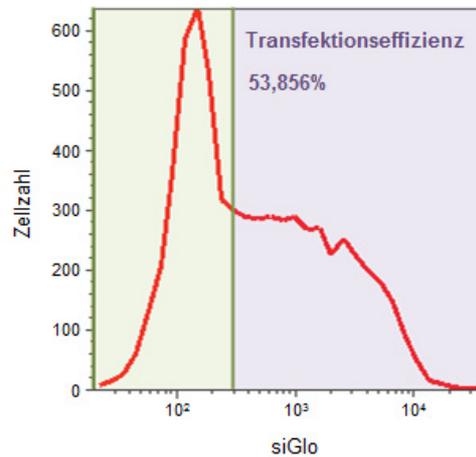


Abb. 8: Transfektionseffizienz primärer T-Lymphozyten mit siRNA. Native T-Zellen wurden aus dem Vollblut gesunder Freiwilliger gewonnen, mit 50 nM DY-547-labeled siGLO RISC-Free Control siRNA transfiziert, mit anti-CD3/CD28-Beads stimuliert und für 24 Stunden inkubiert. Die Auswertung erfolgte am Attune-Durchflusszytometer mit einem 488 nm Laser und einem 575 nm/24 nm Emissionsfilter. Gezeigt ist ein repräsentatives von fünf unabhängigen Experimenten.

Nach Transfektion einer siRNA gegen GR β wurde in stimulierten T-Zellen im Vergleich zur Kontrolltransfektion eine 0,48-fach ($\pm 0,10$) verringerte GR β -Expression gefunden. Die Expression von GR α veränderte sich dabei nicht, wodurch die Spezifität der siRNA gegen GR β nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 9a).

Für weitere Untersuchungen wurden primäre T-Zellen mit siRNA gegen GR β transfiziert, mit anti-CD3/CD28-Beads in Anwesenheit von Hydrokortison stimuliert, und die IL-2-Expression wurde ermittelt. IL-2 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das spezifisch von T-Zellen synthetisiert wird und dessen Aktivität durch Glukokortikoide gehemmt wird [81,10]. Durch Hydrokortison-Behandlung wurde die IL-2-Expression um etwa 12% auf mRNA-Ebene und um ca. 35% auf Proteinebene gehemmt. Der siRNA-vermittelte Knockdown von GR β verringerte die IL-2-Expression zusätzlich um etwa 26% auf mRNA-Ebene bzw. um ca. 14% auf Proteinebene (siehe Abb. 9b und 9c). Dies macht deutlich, dass GR β in humanen T-Zellen Hydrokortison-vermittelte Effekte hemmt.

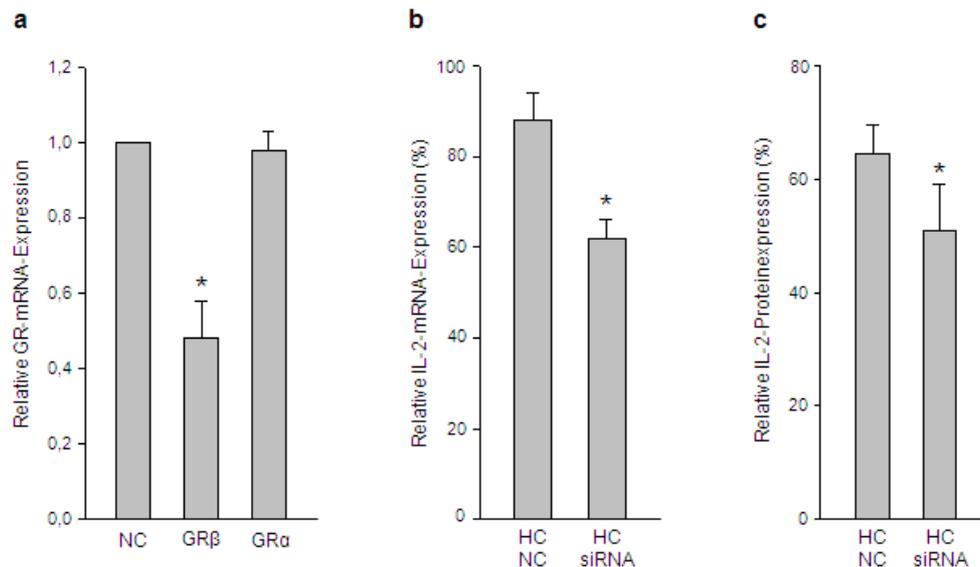


Abb. 9: GR β -Knockdown verstärkt Hydrokortison-vermittelte Effekte. a) Primäre T-Zellen gesunder Probanden wurden mit 50 nM siRNA gegen GR β bzw. Negativkontroll-siRNA (NC) transfiziert, mit anti-CD3/CD28-Beads stimuliert und für 24 Stunden inkubiert. Die mRNA-Expression von GR β und GR α wurde mittels qPCR untersucht und die Ergebnisse wurden relativ zur Kontrolle dargestellt. Mittelwert \pm SD, n = 3, * P < 0,01. b) Aus gesunden Freiwilligen wurden primäre T-Zellen isoliert, mit siRNA gegen GR β transfiziert und für 24 Stunden mit anti-CD3/CD28-Beads in Anwesenheit von Hydrokortison (HC) stimuliert. Die IL-2-mRNA-Expression wurde mittels qPCR ermittelt. Die Ergebnisse wurden relativ zu stimulierten T-Zellen dargestellt. Mittelwert \pm SD, n = 3, * P < 0,01. c) Die IL-2-Proteinexpression in den Zellüberständen wurde mittels Luminex-Technologie analysiert und als Proteinexpression relativ zu stimulierten T-Zellen abgebildet. Mittelwert \pm SD, n = 3, * P < 0,05.

3.1.3. MiRNA-vermittelte Regulation der GR α -Expression

Alternatives Spleißen des Glukokortikoidrezeptors führt zur Entstehung der Isoformen GR α und GR β , die sich hauptsächlich in der Länge ihrer 3'-UTRs unterscheiden: Der GR α -3'-UTR ist um 2505 nt länger als der GR β -3'-UTR. Unter Verwendung von Vorhersageprogrammen für miRNA-Bindestellen wurden *in silico* drei potenzielle miRNA-124-Bindestellen im 3'-UTR von GR α identifiziert. In Folge des alternativen Spleißens sind diese Bindestellen im 3'-UTR von GR β nicht vorhanden, d. h. GR α und GR β könnten durch miRNA-124-Bindung differenziell reguliert werden (siehe Abb. 10).

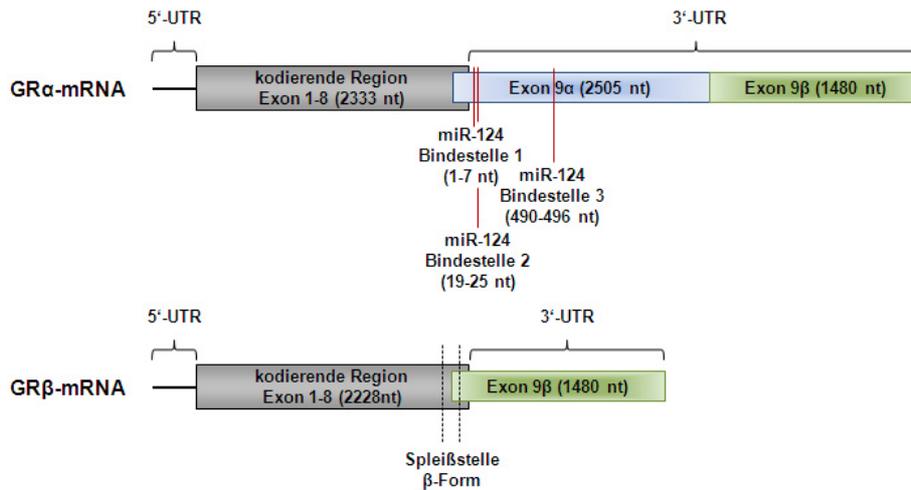


Abb. 10: Schematische Darstellung der Lokalisation von miRNA-124-Bindestellen im GR α -3'-UTR. Der GR α -3'-UTR ist 3985 nt lang und besitzt drei Bindestellen für miRNA-124 (die Positionen ab Beginn des 3'-UTRs sind in Klammern angegeben). GR β entsteht durch alternatives Spleißen von Exon 8 mit strangabwärts gelegenen Elementen von Exon 9, wodurch der 3'-UTR in verkürzter Form vorliegt und die miRNA-124-Bindestellen nicht mehr vorhanden sind.

Ob die *in silico* identifizierte miRNA-124 die GR α -Expression reguliert, wurde durch Reportervektor-Experimente untersucht. Dafür wurde der GR α -3'-UTR mittels PCR amplifiziert und in den psiCHECK-2-Reportervektor kloniert, der sowohl für die *Renilla reniformis*-Luciferase (Rluc) als auch für die *Photinus pyralis* (Firefly)-Luciferase (Fluc) kodiert. Die Rluc-Expression wird durch die Bindung von miRNAs an den 3'-UTR beeinflusst, wohingegen Fluc konstitutiv exprimiert wird und somit als interne Kontrolle dient. HEK-293-Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt und einem miRNA-124-Überexpressionsplasmid (pmr-124) bzw. pmR-Leervektor (NC) co-transfiziert und die Ratio Rluc/Fluc wurde ermittelt. Eine Überexpression von miRNA-124 führte zu einer Reduktion der relativen Luciferaseaktivität um $55 \pm 3\%$ (siehe Abb. 11).

Zur zusätzlichen Überprüfung der Regulation wurden in den einzelnen miRNA-124-Bindestellen im GR α -3'-UTR jeweils zwei Basen deletiert, wodurch miRNA-124 nicht mehr binden konnte. Eine Inaktivierung aller drei miRNA-124-Bindestellen (mutA) führte zu einer kompletten Aufhebung des inhibitorischen Effektes von miRNA-124 ($98 \pm 2\%$). Der Reportervektor mutC, bei dem die dritte miRNA-124-Bindestelle mutiert wurde, wies eine reduzierte relative Luciferaseaktivität auf ($48 \pm 3\%$), die vergleichbar zum nicht-mutiertem Plasmid war, d. h. Bindestelle 3 ist nicht an der miRNA-124-vermittelten Regulation von GR α beteiligt. Durch Mutation der Bindestellen 1 und 2 (mutB) wurde die Interaktion zwischen miRNA-124 und GR α -3'-UTR aufgehoben, was sich in einer annähernd unveränderten relativen

Luciferaseaktivität ($93 \pm 6\%$) im Vergleich zur Kontrolltransfektion äußerte (siehe Abb. 11). Diese Ergebnisse zeigen, dass miRNA-124 durch direkte Bindung an Bindestelle 2 die GR α -Expression regulieren kann. Eine Interaktion zwischen miRNA-124 und Bindestelle 1 wird nicht vermutet, da diese zu Nahe am offenen Leseraster lokalisiert ist.

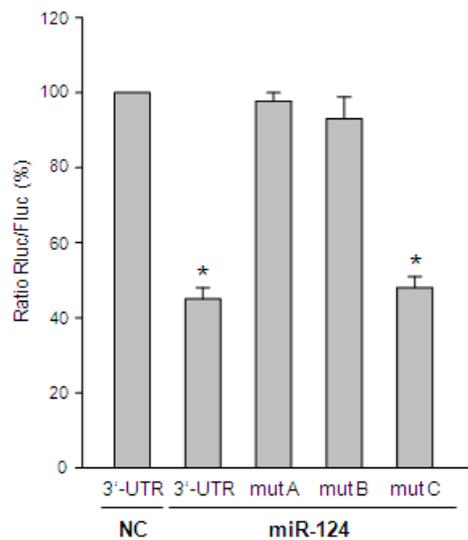


Abb. 11: Direkte Bindung von miRNA-124 an GR α -3'-UTR. Der GR α -3'-UTR wurde in den psiCHECK-2-Luciferasevektor kloniert. Reporterkonstrukte, welche keine miRNA-124-Bindestellen im GR α -3'-UTR aufweisen, wurden durch gerichtete Mutagenese erzeugt (mutA: alle Bindestellen mutiert, mutB: Bindestellen 1 und 2 mutiert, mut C: Bindestelle 3 mutiert). Zudem wurde ein miR-124-Überexpressionsplasmid kloniert (pmr-124). HEK-293-Zellen wurden mit Wildtyp- (3'-UTR) oder mutierten Konstrukten und mit pmr-124 (miR-124) bzw. pmr-Leervektor (NC) co-transfiziert. Die Reporteraktivität wurde durch Luciferase-Assay ermittelt und die Ergebnisse wurden als Rluc/Fluc-Verhältnis relativ zur Kontrolle dargestellt. Mittelwert \pm SD, n = 12, * P < 0,01.

Es wurde nun untersucht, ob miRNA-124 die GR α -Expression in Jurkat-T-Zellen und in primären humanen T-Lymphozyten reguliert. Dazu wurden die Zellen mit premiR-124 Molekülen bzw. der entsprechenden Negativkontrolle transfiziert und T-Zell-Rezeptor spezifisch mit anti-CD3/CD28-Beads stimuliert. MiR-124 führte zu einer deutlichen Reduktion der GR α -mRNA-Expression: In Jurkat-T-Zellen wurde die Expression um etwa 22% und in T-Zellen, trotz geringer Transfektionseffizienz von ca. 40%, um etwa 12% verringert (siehe Abb. 12a und 12b). Der inhibitorische Effekt von miRNA-124 auf die GR α -Expression in Jurkat-T-Zellen wurde in Westernblot-Analysen bestätigt (siehe Abb. 12c). Diese Ergebnisse zeigen, dass miRNA-124 die GR α -Expression in stimulierten T-Zellen reguliert. Die Expression von GR β wurde durch die Transfektion von miRNA-124 nicht beeinflusst.

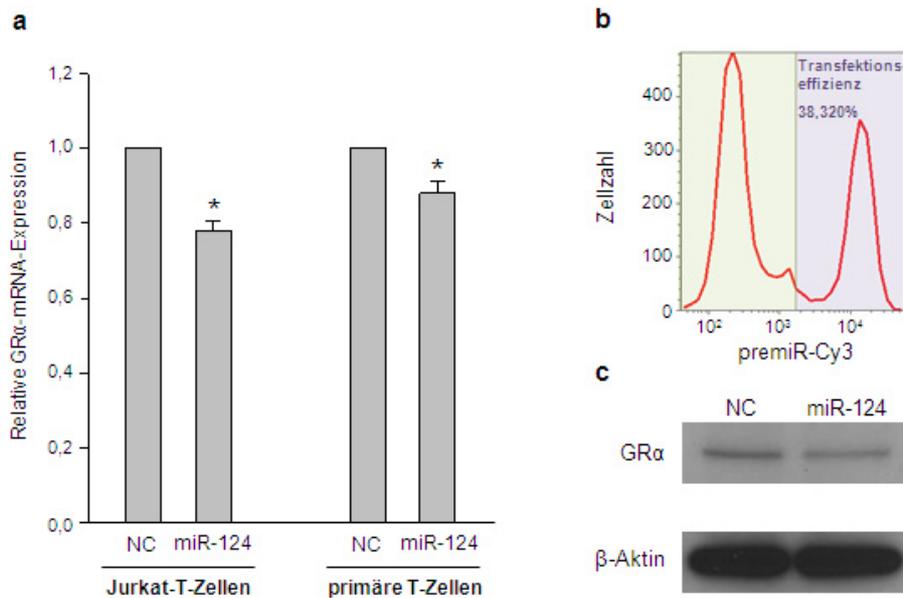


Abb. 12: MiRNA-124 beeinflusst die GR α -Expression in humanen T-Zellen. a) Jurkat-T-Zellen und primäre T-Zellen wurden mit 50 nM premiR-124 bzw. Negativkontrolle (NC) transfiziert, mit anti-CD3/CD28-Beads stimuliert und für 24 Stunden inkubiert. RNA wurde isoliert und die relative GR α -mRNA-Expression wurde mittels qPCR bestimmt. Mittelwert \pm SD, Jurkat-T-Zellen: n = 6, primäre T-Zellen: n = 5, * P < 0,01. b) Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz von nativen T-Zellen mit premiR-Molekülen wurden T-Zellen mit 50 nM Cy3 dye-labeled Pre-miR Negative Control transfiziert. Die Auswertung erfolgte am Attune-Durchflusszytometer mit einer Extinktion bei 488 nm und einem 575 nm/24 nm Emissionsfilter. Es ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten gezeigt. c) Die GR α -Proteinexpression wurde in premiR-124 transfizierten und stimulierten Jurkat-T-Zellen untersucht. β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von sechs unabhängigen Experimenten.

Zur Untersuchung der miRNA-124-Expression in primären humanen T-Zellen wurden T-Lymphozyten aus dem Vollblut gesunder Freiwilliger gewonnen und in An- bzw. Abwesenheit von Hydrokortison mit anti-CD3/CD28-Beads stimuliert. Wie in Abbildung 13 dargestellt, führt die Stimulation der Zellen zu einer 1,7-fachen (\pm 0,4) Erhöhung der miRNA-124-Expression. Eine Behandlung mit Hydrokortison resultierte sogar in einer 2,8-fach (\pm 0,7) gesteigerten Expression von miRNA-124 (siehe Abb. 13).

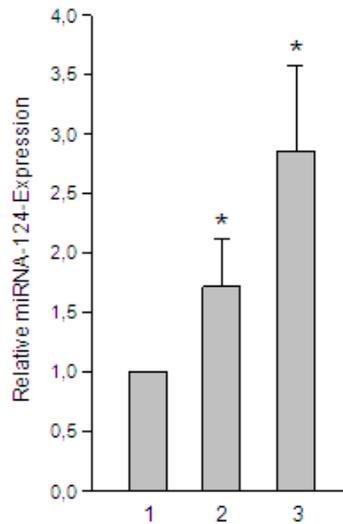


Abb. 13: Expression von miRNA-124 in humanen T-Zellen. RNA wurde aus primären T-Zellen gesunder Probanden isoliert. Die miRNA-124-Expression wurde in 1: nativen T-Zellen, 2: CD3/CD28-stimulierten T-Zellen und 3: CD3/CD28-stimulierten und Hydrokortison-behandelten T-Zellen mittels TaqMan MicroRNA Assay untersucht. Die Ergebnisse wurden relativ zu unstimulierten T-Zellen abgebildet. Mittelwert \pm SD, n = 14, * P < 0,05.

3.1.4. Untersuchung des Expressionsverhaltens von GR α , GR β und miRNA-124 in T-Zellen septischer Patienten

Die Expression von GR α , GR β und miRNA-124 wurde nun in primären T-Lymphozyten septischer Patienten untersucht. Die qPCR-Ergebnisse zeigten im Vergleich zu T-Zellen gesunder Probanden eine geringfügige Reduktion der GR α -Expression (Faktor $0,8 \pm 0,2$), eine 2,1-fache ($\pm 0,04$) Erhöhung der GR β -Expression und eine geringfügige Zunahme der miRNA-124-Expression (Faktor $1,2 \pm 0,5$) (siehe Abb. 14).

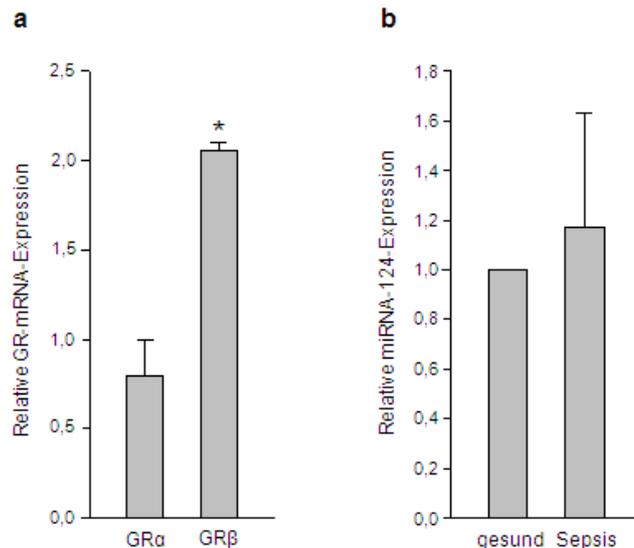


Abb. 14: Expression von GR α , GR β und miRNA-124 in T-Zellen von Sepsis-Patienten. Primäre T-Zellen wurden aus dem Blut von Sepsis-Patienten isoliert und RNA wurde gewonnen. a) Die mRNA-Expression von GR α und GR β wurde mittels qPCR bestimmt und relativ zu nativen T-Zellen gesunder Probanden dargestellt. Mittelwert \pm SD, n = 20, * P < 0,01. b) Die miRNA-124-Expression in T-Zellen von Sepsis-Patienten wurde mittels TaqMan MicroRNA Assay ermittelt und relativ zu nativen T-Zellen gesunder Freiwilliger abgebildet. Mittelwert \pm SD, n = 20.

3.1.5. Diskussion der Ergebnisse 1

Als möglicher Mechanismus zur Entstehung einer Kortikosteroidresistenz wird die Verschiebung der GR-Expression zur dominant negativen GR β -Form hin diskutiert [28,22,80]. Bisher war bekannt, dass GR β in humanen neutrophilen Granulozyten sowie in verschiedenen Tumorzelllinien (z. B. HeLa S3-Zellen und CEMC7-Zellen) in wesentlich geringeren Mengen exprimiert wird als GR α und dass proinflammatorische Zytokine zu einer gesteigerten GR β -Expression führen. Es wurde vermutet, dass dies die Entstehung einer Glukokortikoid-Insensitivität begünstigt [95,88,71,54].

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass auch in primären humanen T-Zellen GR β in geringeren Mengen exprimiert wird als GR α (siehe Tabelle 6). Ein siRNA-vermittelter Knockdown von GR β führte zu einer deutlichen Verstärkung anti-inflammatorischer Hydrokortison-Effekte. Dies zeigt, dass GR β trotz seiner geringen Expression die Wirkungen von Glukokortikoiden in humanen T-Zellen relevant inhibiert (siehe Abb. 9).

Die vorliegende Arbeit zeigt zudem, dass die Stimulation von T-Lymphozyten zu einer signifikanten Erhöhung der GR α -Expression führt, was eine sensitivere

Reaktion auf antiinflammatorische Immunmodulatoren, wie Glukokortikoide, ermöglicht. Diese Stimulation-induzierte Steigerung der GR α -Expression kann durch Hydrokortison-Gabe inhibiert werden. Die GR β -Expression hingegen wird weder durch T-Zell-Rezeptor-spezifische Stimulation noch durch Hydrokortison-Behandlung beeinflusst (siehe Abb. 7). Das hieraus resultierende reduzierte GR α :GR β -Expressionsverhältnis könnte zu einer eingeschränkten Glukokortikoid-Sensitivität stimulierter T-Lymphozyten beitragen.

Die molekularen Mechanismen, die zu einer Hydrokortison-vermittelten Reduktion der GR α -Expression führen, wurden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die mRNAs von GR α und GR β in der Länge ihrer exprimierten 3'-UTRs unterscheiden und differenziell durch miRNA-124 reguliert werden: Der GR α -3'-UTR ist um 2505 nt länger als der 3'-UTR von GR β , enthält drei miRNA-124-Bindestellen und ermöglicht eine Regulation der GR α -Expression durch miRNA-124 (siehe Abb. 10, Abb. 11 und Abb. 12). Alternatives Spleißen des GRs führt dazu, dass diese miRNA-Bindestellen im GR β -3'-UTR nicht mehr vorhanden sind und sich GR β damit der Regulation durch miRNA-124 entzieht (siehe Abb. 10). Es wurde auch gezeigt, dass die Expression endogener miRNA-124 durch Stimulation der T-Lymphozyten signifikant erhöht und durch eine zusätzliche Hydrokortison-Gabe verstärkt wird (siehe Abb. 13). Eine gesteigerte miRNA-124-Expression inhibiert vermehrt die GR α -Expression und könnte die gefundene reduzierte GR α -Expression nach Hydrokortison-Behandlung stimulierter T-Zellen erklären.

Diese Ergebnisse zeigen, dass in humanen T-Zellen alternatives Spleißen und nachfolgende miRNA-Regulationsmechanismen zur Entstehung einer Imbalance in der Expression der GR-Spleißvarianten führen und somit zur Entwicklung einer Steroidresistenz beitragen können (siehe Abb. 15): Glukokortikoide diffundieren in das Zytoplasma und binden an GR α , wodurch GR α in den Zellkern transloziert und durch Bindung an GREs die Genexpression reguliert (1). Diese Effekte werden durch eine Inflammations-vermittelte Erhöhung der GR α -Expression verstärkt (2). Die Behandlung der Zellen mit Glukokortikoiden führt zu einem starken Anstieg der miRNA-124-Expression (3). MiRNA-124 bindet an den GR α -3'-UTR und reduziert die GR α -Expression, wodurch eine Imbalance in der Expression der GR-Spleißvarianten zugunsten der dominant negativen β -Form entsteht (4). GR β hemmt die GR α -

Aktivität und führt zur Verringerung der immunsuppressiven und antiinflammatorischen Wirkung von Glukokortikoiden (5).

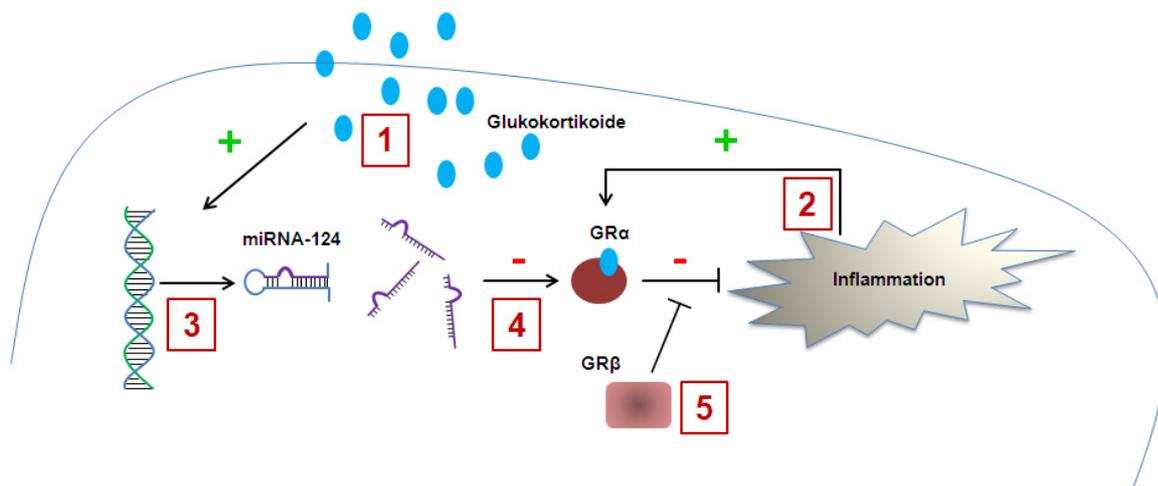


Abb. 15: Schematische Darstellung des miRNA-124-vermittelten negativen Rückkopplungsmechanismus.

Bei verschiedenen inflammatorischen Krankheitsbildern, wie chronischer lymphozytischer Leukämie und Asthma, wurde bereits auf eine Beteiligung eines veränderten $GR\alpha:GR\beta$ -Expressionsverhältnisses in der Entstehung einer Kortikosteroidresistenz hingewiesen [80,28].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass auch im Krankheitsverlauf der Sepsis Veränderungen des GR-Expressionsverhältnisses auftreten: Im Vergleich zu nativen T-Lymphozyten gesunder Probanden wurde in T-Zellen septischer Patienten eine leichte Reduktion der $GR\alpha$ -Expression und eine signifikant gesteigerte $GR\beta$ -Expression gefunden. Die Ergebnisse zeigen zudem eine geringfügige Zunahme der miRNA-124-Expression in den Patientenproben (siehe Abb. 14). Dies bedeutet, dass eine miRNA-124-vermittelte Regulation der $GR\alpha$ -Expression bei Sepsis möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein miRNA-vermittelter Regulationsmechanismus der GR-Expression gezeigt, der potenziell von hoher klinischer Relevanz ist: Bei Behandlung von Sepsis-Patienten mit Hydrokortison besteht die Gefahr, dass über eine Steigerung der miRNA-124-Expression eine Reduktion der $GR\alpha$ -Expression induziert wird. Vor allem in septischen Patienten mit erhöhter $GR\beta$ -Expression kann dieser Mechanismus die Entwicklung einer Kortikosteroidresistenz begünstigen.

3.2. Regulation der Expression von MGMT durch alternative Polyadenylierung und miRNA-Bindung bei Glioblastomen

3.2.1. Untersuchung des Expressionsprofils der MGMT-Transkriptvarianten in Glioblastomen

Die Daten einer neueren Studie lassen vermuten, dass die MGMT-Expression nicht nur durch Promotormethylierung sondern auch durch posttranskriptionelle Regulationsmechanismen beeinflusst wird [51]. Eine miRNA-vermittelte Regulation der MGMT-Expression wäre somit denkbar und sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Es wurde zunächst mittels „NCBI Reference Sequences“ (RefSeq) der MGMT-3'-UTR identifiziert. Dabei zeigte sich, dass potenziell zwei mögliche MGMT-Transkriptvarianten existieren, die sich in der Länge ihrer exprimierten 3'-UTRs unterscheiden und durch alternative Polyadenylierung entstehen könnten: Bioinformatische Untersuchungen ermittelten zwei Polyadenylierungssequenzen im längeren MGMT-3'-UTR. Die erste kanonische Polyadenylierungsstelle („ATTAAA“) könnte zur Entstehung eines kürzeren MGMT-Transkriptes (NM_002412.1) mit einer 3'-UTR-Länge von 105 nt führen. Durch Verwendung der alternativen Polyadenylierungssequenz („AAGAAA“) könnte eine MGMT-Isoform (NM_002412.3) mit einem 522 nt langen 3'-UTR exprimiert werden (siehe Abb. 16a).

Um die Existenz verschieden langer MGMT-3'-UTR-Varianten in Normalhirngewebe und in GBM-Biopsaten experimentell zu verifizieren, wurde eine 3'-RLM-RACE durchgeführt. Dazu wurde RNA unter Verwendung eines 3'-RACE-Adapters in cDNA revers transkribiert, der komplementär zum Poly(A)-Ende einer mRNA war. In PCR-Reaktionen erfolgte eine Amplifikation der cDNA-Sequenzen zwischen einem MGMT- und einem Adapter-spezifischen Primer, wodurch verschieden lange DNA-Fragmente entstanden, die elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Im Normalhirn wurde nur ein DNA-Fragment mit einer Länge von 440 nt amplifiziert, das mit der vorhergesagten kürzeren MGMT-3'-UTR-Variante übereinstimmte (siehe Abb. 16b). In GBM-Biopsaten wurden hingegen zwei Banden mit einer Größe von 440 nt und 850 nt detektiert, die der vorhergesagten kurzen und der vorhergesagten langen 3'-UTR-Variante entsprachen (siehe Abb. 16b). Die Expression der jeweiligen

MGMT-3'-UTR-Varianten in Normalhirngewebe bzw. in GBM wurde mittels Sequenzierung bestätigt.

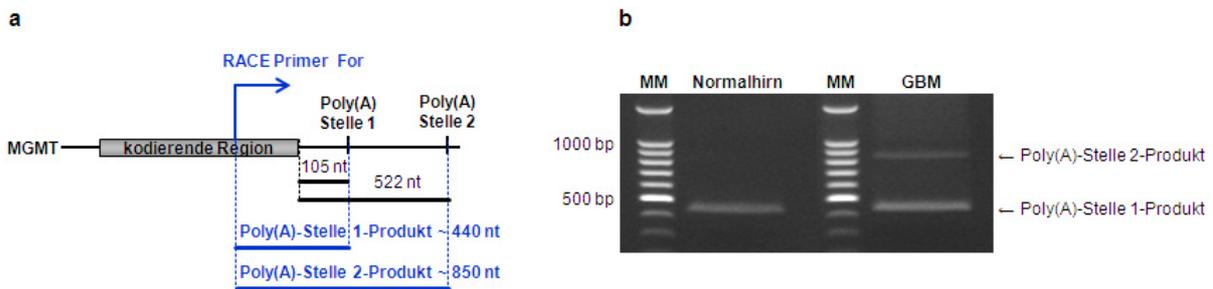


Abb. 16: Identifikation von zwei Polyadenylierungsstellen im MGMT-3'-UTR. a) Schematische Darstellung der Polyadenylierungsstellen (Poly(A)) im 3'-UTR von MGMT sowie die Länge der 3'-UTR-Varianten. Angegeben ist die Bindungsstelle des verwendeten MGMT-spezifischen Primers (RACE Primer for) und die erwarteten 3'-RACE-Produktlängen. b) 3'-RLM-RACE wurde mit RNA aus Normalhirngewebe oder GBM-Biopsaten durchgeführt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten (MM, Molekulargewichtsmarker).

Um eine mögliche Korrelation zwischen MGMT-3'-UTR-Länge und MGMT-mRNA-Expression in Normalhirngewebe bzw. in GBM zu untersuchen, wurden qPCR-Assays designed, die eine spezifische Quantifizierung der langen bzw. der kurzen 3'-UTR-Variante ermöglichten. Hierbei wurde eine inverse Korrelation zwischen der Expression der 3'-UTR-Varianten und der MGMT-Expression gefunden ($R = -0,86$): Eine erhöhte Expression der langen 3'-UTR-Variante korrelierte mit einer reduzierten MGMT-mRNA-Expression, bzw. die Expression der kurzen 3'-UTR-Variante korrelierte mit einer gesteigerten MGMT-mRNA-Expression (siehe Abb. 17a).

Basierend auf Daten unserer Arbeitsgruppe [51] wurden die GBM-Biopsate nach MGMT-mRNA-Expression in drei Gruppen unterteilt: geringe MGMT-Expression (relative Expression $< 0,35$), mittlere MGMT-Expression (relative Expression $> 0,35$, $< 0,75$) und hohe MGMT-Expression (relative Expression $> 0,75$). Im Vergleich zum Normalhirngewebe wurde in GBM mit geringer MGMT-Expression eine signifikant erhöhte Expression der langen 3'-UTR-Variante gefunden (Faktor $5,2 \pm 2,1$), wohingegen GBM mit einer mittleren MGMT-mRNA-Expression geringfügig weniger MGMT-3'-UTR lang exprimierten (Faktor $3,4 \pm 1,1$). In GBM-Biopsaten mit einer hohen MGMT-mRNA-Expression wurden keine Veränderungen des 3'-UTR-Expressionsprofils im Vergleich zu Normalhirngewebe gefunden (Faktor $1,2 \pm 0,6$) (siehe Abb. 17b). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine reduzierte MGMT-mRNA-Expression mit der Expression der langen MGMT-3'-UTR-Variante einhergeht.

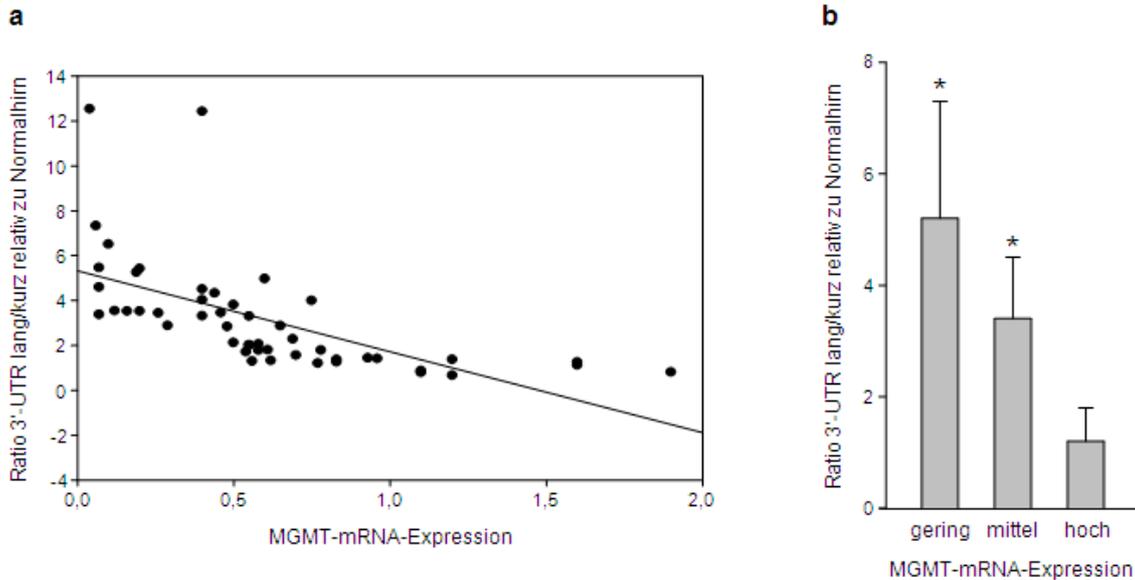


Abb. 17: Expression der MGMT-3'-UTR-Varianten in GBM-Biopsaten. a) Die Expression der MGMT-3'-UTR-Varianten in Normalhirn ($n = 6$) und in GBM ($n = 49$) wurde mittels qPCR untersucht. Dargestellt ist die Korrelation der MGMT-mRNA-Expression mit dem Verhältnis zwischen langem und kurzem MGMT-3'-UTR in GBM relativ zu Normalhirn. $R = -0,86$, $P < 0,0001$. b) Die GBM-Gewebeproben wurden nach MGMT-mRNA-Expression in drei Gruppen eingeteilt: geringe MGMT-Expression ($n = 13$), mittlere MGMT-Expression ($n = 25$), hohe MGMT-Expression ($n = 11$). Die Ergebnisse der qPCR wurden als Ratio 3'-UTR lang zu kurz relativ zu Normalhirn abgebildet. Mittelwert \pm SEM, * $P < 0,05$.

3.2.2. Einfluss der MGMT-Isoformen auf die mRNA-Stabilität und die Proteinexpression

Es wurde nun untersucht, wie sich die Expression verschiedener 3'-UTR-Längen auf die MGMT-Proteinexpression auswirkt. Hierzu wurde die lange MGMT-3'-UTR-Variante mittels PCR amplifiziert und in den Luciferasevektor psiCHECK-2 strangabwärts der kodierenden Region des Rluc-Gens kloniert. Zur Herstellung eines Reporterkonstruktes mit der kurzen 3'-UTR-Variante wurde mittels gerichteter Mutagenese nach der ersten kanonischen Polyadenylierungsstelle eine *NotI*-Schnittstelle eingefügt und die strangabwärts gelegenen Sequenzen des langen MGMT-3'-UTRs mittels Restriktionsverdau entfernt. Die Reporterplasmide wurden in HEK-293-Zellen transfiziert und die relative Luciferaseaktivität wurde ermittelt. Wie in Abbildung 18 dargestellt, führte die Transfektion des Reportervektors mit der kurzen MGMT-3'-UTR-Variante zu einer erhöhten relativen Luciferaseaktivität ($2,7 \pm 0,5$), wohingegen nach Transfektion des Luciferasevektors mit der langen 3'-UTR-Variante eine relative Reporteraktivität von $1,3 \pm 0,1$ ermittelt werden konnte. Daraus lässt

sich folgern, dass die Expression der langen MGMT-3'-UTR-Variante zu einer geringeren Proteinexpression führt.

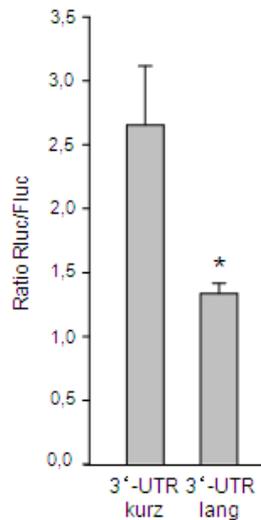


Abb. 18: Reduktion der Proteinexpression durch 3'-UTR-Verlängerung. Die MGMT-3'-UTR-Varianten wurden in den psiCHECK-2-Reportervektor kloniert. Die Luciferasevektoren wurden in HEK-293-Zellen transfiziert und die Proteinexpression wurde mittels Luciferase-Assay ermittelt. Die Luciferaseaktivität wurde als Rluc/Fluc-Verhältnis dargestellt. Mittelwert \pm SEM, n = 6, * P < 0,05.

Um zu untersuchen, ob die unterschiedliche Proteinexpression der beiden MGMT-3'-UTR-Varianten auf eine reduzierte mRNA-Stabilität zurückzuführen ist, wurde das Tet-Off-Genexpressionssystem verwendet. Dazu wurde die kodierende Region des Rluc-Gens zusammen mit der jeweiligen MGMT-3'-UTR-Variante in den pTRE-Tight-Vektor kloniert und in HEK-293-Tet-Off-Advanced Zellen transfiziert. Diese Zellen exprimieren stabil ein Tetracyclin-abhängiges Transaktivatorprotein (tTA), das mit einem Tetracyclin-spezifischen Promotor interagiert und die Transkription nachgeschalteter Gene initiiert. Durch Zugabe von Doxycyclin wird tTA inaktiviert und somit die Transkription des hier klonierten Rluc-Gens mit der jeweiligen MGMT-3'-UTR-Variante inhibiert. Die Stabilität der vorhandenen Rluc-mRNA bzw. des Rluc-Proteins nach Doxycyclin-Behandlung wurde mittels qPCR bzw. Luciferase-Assay untersucht. Im Vergleich zur Expression der kurzen MGMT-3'-UTR-Variante führte die Expression der langen 3'-UTR-Variante zu einer signifikanten Reduktion der Rluc-mRNA um etwa 42% (siehe Abb. 19a). Dies konnte auf Proteinebene durch eine verminderte Luciferaseaktivität um ca. 48% bestätigt werden (siehe Abb. 19b). Durch Expression der langen MGMT-3'-UTR-Variante wird somit die mRNA-Stabilität verringert, wodurch signifikant weniger Protein translatiert wird.

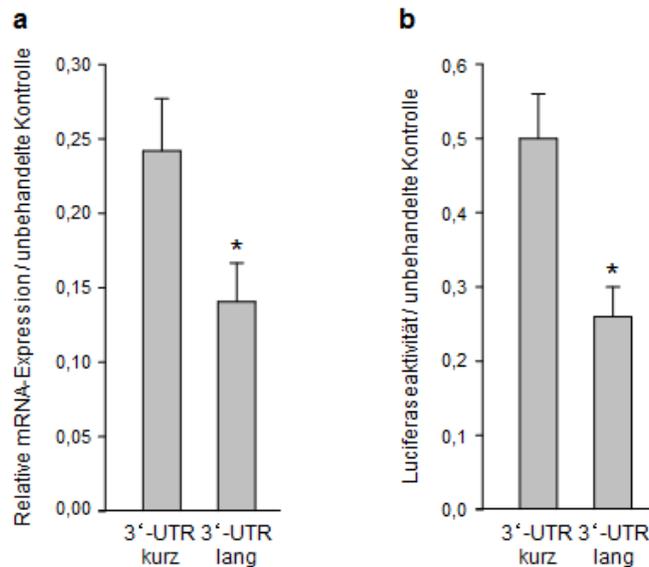


Abb. 19: Reduktion der mRNA-Stabilität und der Proteinexpression durch 3'-UTR-Verlängerung. a) Für Tet-Off-Experimente wurde Rluc zusammen mit der jeweiligen MGMT-3'-UTR-Variante aus den Reportervektoren isoliert und in den pTRE-Tight-Vektor kloniert. HEK-293-Tet-Off-Advanced-Zellen wurden transient mit dem pTRE-Tight-Plasmid und dem pTRE-Tight-Firefly-Luciferasevektor transfiziert, der als Kontrolle für die Transfektionseffizienz diente. 30 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit Doxycyclin behandelt. Die Transkriptstabilität wurde 8 Stunden nach Doxycyclin-Zugabe mittels qPCR (n = 5) oder b) 30 Stunden nach Doxycyclin-Behandlung durch Luciferase-Assay (n = 5) bestimmt. Dargestellt wurden die Rluc-Expressionswerte in Doxycyclin-behandelten Zellen relativ zu unbehandelten Zellen. Mittelwert \pm SEM, * P < 0,05.

3.2.3. MiRNA-vermittelte Regulation der langen MGMT-Transkriptvariante

Die Stabilität der MGMT-mRNA könnte durch AU-reiche Elemente oder miRNA-Bindestellen in der langen MGMT-3'-UTR-Variante reguliert sein [36,86]. *In silico* Analysen zeigten keine AU-reichen Elemente im MGMT-3'-UTR, jedoch konnten unter Verwendung von vier Erkennungsprogrammen für miRNA-Zielsequenzen (TargetScan, PITA, RNA22 und miRDB) mehrere hochwahrscheinliche miRNA-Bindestellen im MGMT-3'-UTR identifiziert werden: Es wurden drei potenzielle Bindestellen in der kurzen MGMT-3'-UTR-Variante und sieben potenzielle Bindestellen in der langen Transkriptvariante identifiziert. Eine Bindestelle für miRNA-181d wurde in beiden MGMT-3'-UTR-Varianten gefunden (siehe Abb. 20).

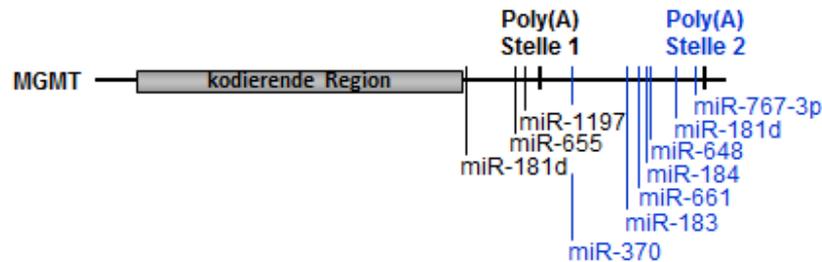


Abb. 20: Schematische Darstellung der miRNA-Bindestellen in den MGMT-3'-UTR-Varianten. Mittels bioinformatischer Analysen wurden in der kurzen MGMT-Transkriptvariante drei (schwarz) und in der langen MGMT-3'-UTR-Variante sieben (blau) potenzielle miRNA-Bindestellen identifiziert.

Ob die *in silico* vorhergesagten miRNAs die MGMT-Expression regulieren, wurde durch Experimente mit Reportervektoren untersucht. Wie in Abbildung 21a dargestellt, unterliegt der kurze MGMT-3'-UTR keiner miRNA-Regulation: Im Vergleich zur Kontrolltransfektion regulierten weder miRNA-1197, noch miRNA-655, noch miRNA-181d die relative Luciferaseaktivität signifikant (siehe Abb. 21a). Die lange MGMT-3'-UTR-Variante hingegen wird durch mehrere der *in silico* identifizierten miRNAs reguliert: Durch Transfektion von miRNA-661 und miRNA-370 wurde die relative Luciferaseaktivität signifikant reduziert (Reduktion um: $14 \pm 8\%$, miRNA-661; $16 \pm 6\%$, miRNA-370). Die stärkste Reduktion der relativen Luciferaseaktivität wurde durch Transfektion von miRNA-181d, miRNA-767-3p und miRNA-648 erzielt (Reduktion um: $30 \pm 2\%$, miRNA-181d; $32 \pm 2\%$, miRNA-767-3p; $37 \pm 4\%$, miRNA-648). MiRNA-184 und miRNA-183 zeigten keine Wirkung auf die relative Luciferaseaktivität (siehe Abb. 21b).

Zum zusätzlichen Nachweis einer direkten Bindung von miRNA-181d, miRNA-767-3p und miRNA-648 wurden die Bindestellen im psiCHECK-2-Reporterkonstrukt jeweils durch gerichtete Mutagenese deletiert. Die so erstellten mutierten Plasmide bzw. der Wildtyp-Reportervektor wurden mit den entsprechenden premiR-Molekülen in HEK-293-Zellen co-transfiziert und die relative Luciferaseaktivität wurde ermittelt. Im Vergleich zum Wildtyp-Plasmid, bei dem eine signifikante Reduktion der relativen Luciferaseaktivität erreicht wurde, konnte durch die Co-Transfektion der mutierten Reporterkonstrukte mit den jeweiligen premiR-Molekülen keine Veränderungen der relativen Luciferaseaktivität gefunden werden (siehe Abb. 21c). Daraus lässt sich folgern, dass miRNA-181d, miRNA-767-3p und miRNA-648 spezifisch mit der langen MGMT-3'-UTR-Variante interagieren.

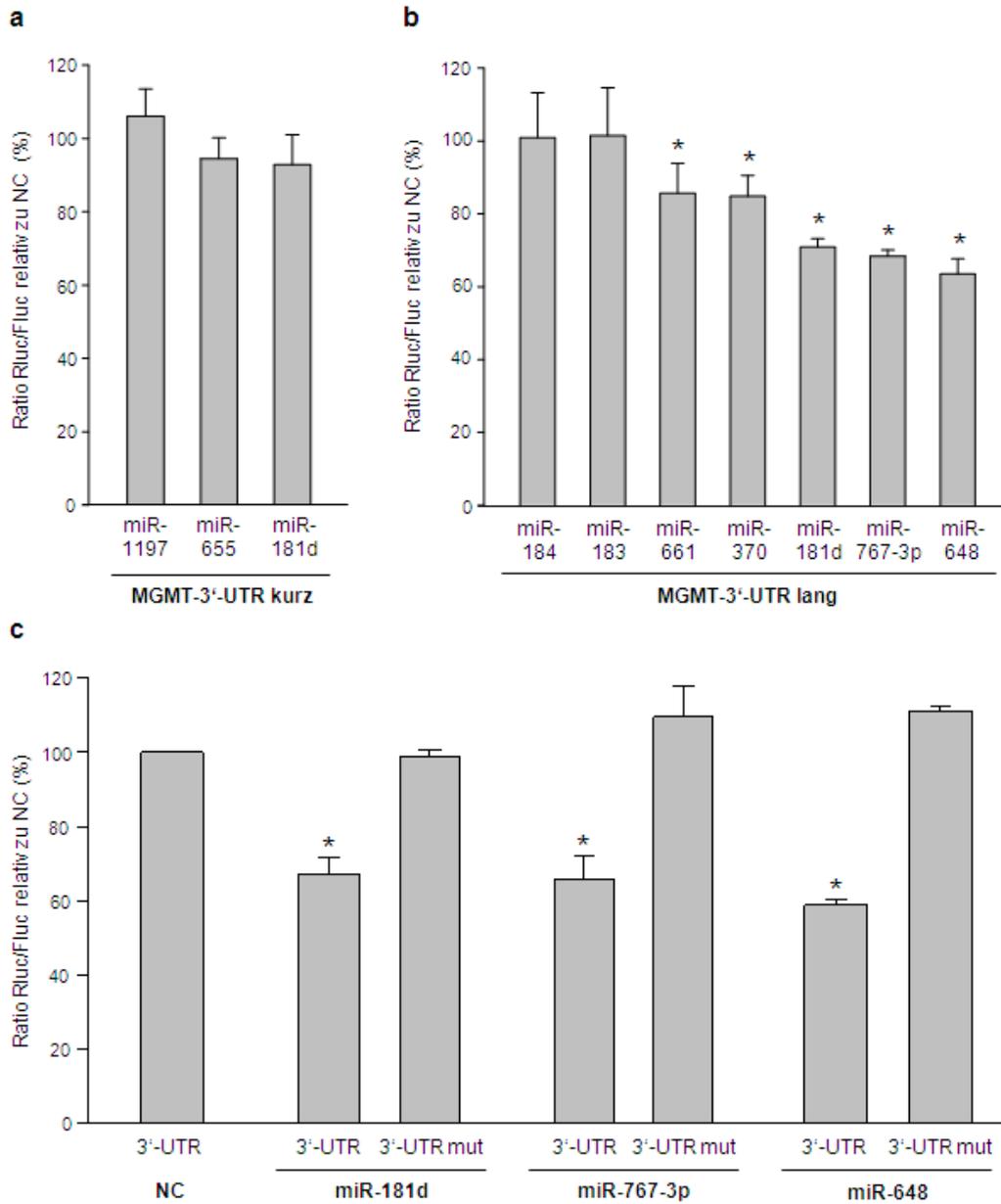


Abb. 21: Bindung von miRNAs an die MGMT-3'-UTR-Varianten. a) U87MG-Zellen wurden mit psiCHECK-MGMT-3'-UTR kurz und den angegebenen premiR-Molekülen (50 nM) bzw. mit einer premiR-Negativkontrolle (50 nM) transfiziert. Die Reporteraktivität wurde mittels Luciferase-Assay bestimmt und die Werte wurden als Rluc/Fluc-Verhältnis relativ zur Kontrolle dargestellt. Mittelwert \pm SEM, $n = 6$. b) PsiCHECK-2-Reporterplasmid mit kloniertem langen MGMT-3'-UTR wurde zusammen mit den angegebenen premiR-Molekülen (50 nM) in U87MG-Zellen transfiziert und die Luciferaseaktivität wurde ermittelt. Die Ergebnisse wurden als Rluc/Fluc-Verhältnis relativ zur Kontrolle angegeben. Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * $P < 0,05$. c) Die Bindestellen von miRNA-181d, miRNA-767-3p und miRNA-648 wurden im psiCHECK-2-Vektor mit dem langen MGMT-3'-UTR mittels gerichteter Mutagenese inaktiviert. Diese mutierten Plasmide (3'-UTR mut) bzw. der Wildtyp-Plasmid (3'-UTR) wurden zusammen mit den angegebenen premiR-Molekülen (50 nM) bzw. mit einer Negativkontrolle (50 nM) in HEK-293-Zellen transfiziert und die Luciferaseaktivität wurde bestimmt. Das Rluc/Fluc-Verhältnis wurde relativ zur Kontrolle abgebildet. Mittelwert \pm SEM, $n = 5$, $P < 0,05$.

Es wurde nun untersucht, ob die in den Reporterversuchen identifizierten miRNAs die MGMT-Expression tatsächlich regulieren. Dazu wurden Zellen mit premiR-Molekülen transfiziert und die MGMT-Expression wurde mittels qPCR und Westernblot-Analysen bestimmt. Nach Transfektion von miRNA-181d und miRNA-767-3p wurde eine signifikante Reduktion der MGMT-mRNA-Expression ermittelt (miRNA-181d: Faktor $0,83 \pm 0,03$; miRNA-767-3p: Faktor $0,67 \pm 0,18$), die auch auf Proteinebene gefunden werden konnte. MiRNA-648 führte zu keiner signifikanten Verringerung der MGMT-mRNA-Expression (Faktor $1,01 \pm 0,16$), jedoch zu einer fast vollständigen Reduktion der MGMT-Proteinexpression. MiRNA-661 und miRNA-370 reduzierten weder die MGMT-mRNA-Expression noch die MGMT-Proteinexpression (siehe Abb. 22). Diese Ergebnisse zeigen, dass die MGMT-Expression durch miRNA-181d, miRNA-767-3p und miRNA-648 gehemmt wird. Dabei erzielen miRNA-181d und miRNA-767-3p ihre inhibitorischen Effekte auf mRNA-Ebene, wohingegen miRNA-648 auf translationaler Ebene die MGMT-Expression reguliert.

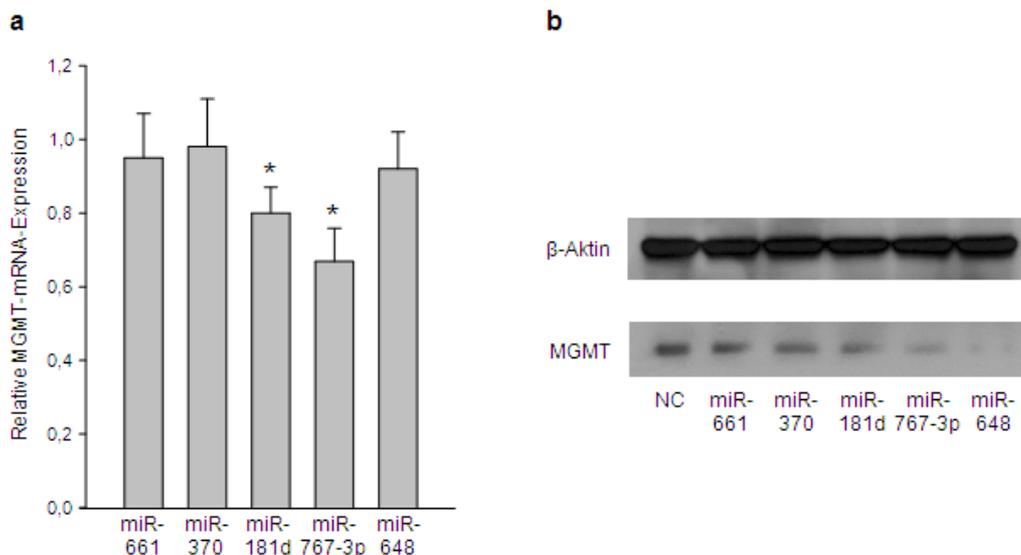


Abb. 22: MiRNA-vermittelte Regulation der MGMT-Expression. A549-Zellen wurden transient mit den angegebenen premiR-Molekülen (50 nM) bzw. einer Negativkontrolle (50 nM) transfiziert. a) 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die MGMT-mRNA-Expression wurde mittels qPCR untersucht. Die Ergebnisse wurden relativ zur Negativkontrolle dargestellt. Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, $P < 0,05$. b) Proteingestamtextrate wurden gewonnen und die MGMT-Proteinexpression wurde mittels Westernblot-Analyse detektiert. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von sechs unabhängigen Experimenten.

Die Expression der MGMT-regulierenden miRNAs wurde nun in GBM mittels qPCR untersucht. Im Vergleich zu Normalhirngewebe konnte in GBM eine signifikant gesteigerte Expression von miRNA-648 (Faktor $2,1 \pm 0,4$) und miRNA-767-3p (Faktor $10,1 \pm 1,9$) gefunden werden. MiRNA-181d weist in GBM keine Expressionsveränderungen im Vergleich zu Normalhirn auf (Faktor $1,1 \pm 0,2$) (siehe Abb. 23). Die MGMT-regulierenden miRNAs werden somit in GBM exprimiert, im Fall von miRNA-648 und miRNA-767-3p sogar in einer deutlich erhöhten Expressionsrate im Vergleich zum Normalhirngewebe.

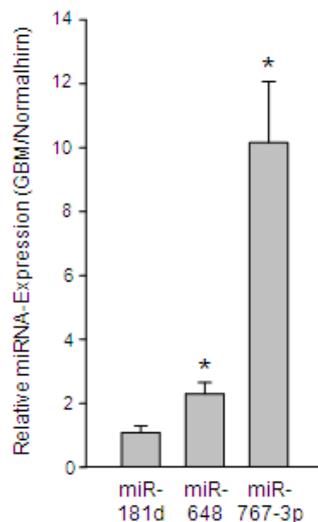


Abb. 23: Expression der MGMT-regulierenden miRNAs in GBM-Biopsaten. Die Expression der angegebenen miRNAs in GBM wurde mittels TaqMan MicroRNA Assay und Normalisierung auf RNU6b ermittelt. Dargestellt wurden die miRNA-Expressionsraten relativ zu Normalhirngewebe. Mittelwert \pm SEM, n = 19, * P < 0,05.

3.2.4. Einfluss von miRNAs auf die TMZ-Sensitivität von Gliomzellen

Es ist bekannt, dass MGMT DNA-Schäden durch Chemotherapeutika, wie TMZ, repariert. Zellen, die wenig MGMT exprimieren sprechen folglich besser auf eine Therapie mit TMZ an als Zellen, die eine hohe MGMT-Expressionsrate aufweisen [8,45].

Es wurde nun untersucht, ob die MGMT-regulierenden miRNAs tatsächlich die Sensitivität von Gliomzellen auf TMZ durch Reduktion der MGMT-Expression erhöhen. Dafür wurden Zellen der MGMT exprimierenden Zelllinie T98G mit allen drei MGMT-regulierenden miRNAs gleichzeitig transfiziert. Die Westernblot-Analysen zeigten, dass dadurch die MGMT-Proteinexpression deutlich verringert wurde (siehe

Abb. 24a). Transfizierte T98G-Zellen wurden mit unterschiedlichen TMZ-Konzentrationen behandelt und die Zellviabilität wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Wie in Abbildung 24b dargestellt, wurden ohne TMZ-Behandlung keine signifikanten Unterschiede in der Viabilität der T98G-Zellen gefunden. Eine Behandlung mit 100 μM bzw. 500 μM TMZ führte in premiR-transfizierten Zellen zu einer stark verminderten Zellviabilität (Reduktion um 37% bzw. 25% im Vergleich zur Kontrolltransfektion) (siehe Abb. 24b). An diesem Effekt waren alle drei MGMT-regulierenden miRNAs beteiligt (siehe Abb. 24c). Diese Ergebnisse zeigen, dass durch eine miRNA-vermittelte Reduktion der MGMT-Expression die zytotoxische Wirkung von TMZ auf Gliomzellen erhöht wird.

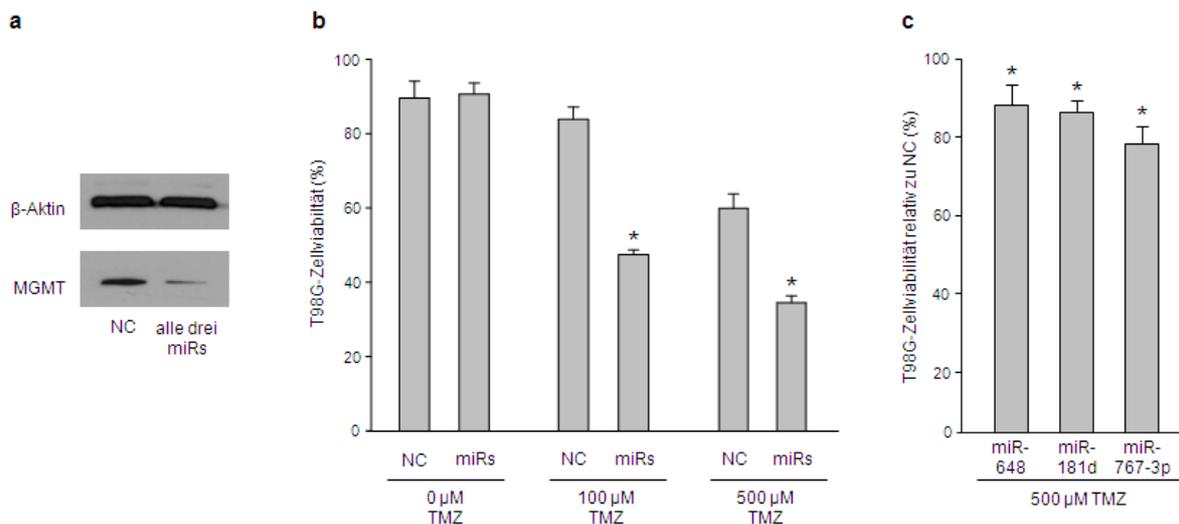


Abb. 24: Einfluss der MGMT-regulierenden miRNAs auf die Zellviabilität nach TMZ-Gabe. T98G-Zellen wurden gleichzeitig mit 20 nM premiR-181d, -648 und -767-3p bzw. mit 60 nM Negativkontrolle transfiziert. a) 24 Stunden nach Transfektion wurden Proteingestamtextakte gewonnen und die MGMT-Proteinexpression wurde mittels Westernblot-Analyse detektiert. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten. b) 12 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für weitere 12 Stunden mit TMZ bzw. DMSO in den angegebenen Konzentrationen behandelt und die Zellviabilität wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Die Ergebnisse wurden als % Viabilität TMZ-behandelter Zellen relativ zu DMSO-behandelten Zellen dargestellt. Mittelwert \pm SEM, n = 6, * P < 0,01. c) T98G-Zellen wurden mit 50 nM der angegebenen premiR-Moleküle bzw. mit einem negativen Kontrollmolekül (50 nM) transfiziert und 12 Stunden nach Elektroporation mit 500 μM TMZ behandelt. 12 Stunden nach TMZ-Zugabe wurde die Zellviabilität mittels MTT-Assay untersucht. Die Werte wurden als % Zellviabilität relativ zur Kontrolltransfektion dargestellt. Mittelwert \pm SEM, n = 6, * P < 0,05.

3.2.5. Diskussion der Ergebnisse 2

Der *MGMT*-Promotormethylierungsstatus dient als prädiktiver Faktor für die Ansprechrate von GBM-Patienten auf Chemotherapie mit alkylierenden Agenzien [92]. Es wurde bereits gezeigt, dass eine Methylierung des *MGMT*-Promotors sowohl zu einer reduzierten *MGMT*-Expression als auch zu einer besseren Ansprechrate auf alkylierende Chemotherapeutika und zu einem verlängerten Überleben der Patienten führt [94,34]. Jedoch ist der Regulationsmechanismus der *MGMT*-Expression bislang nicht vollständig aufgeklärt, wodurch die Verwendung von *MGMT* als alleinigen Biomarker zur Stratifizierung von Patienten nicht geeignet ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Polyadenylierungssignale im 3'-UTR von *MGMT* identifiziert, die zur Entstehung von zwei *MGMT*-Transkriptvarianten mit unterschiedlichen 3'-UTR-Längen führen: Durch die Verwendung der vorderen kanonischen Polyadenylierungssequenz wird eine *MGMT*-mRNA mit einem kurzen 3'-UTR exprimiert, die sowohl im Normalhirngewebe als auch in GBM-Biopsaten gefunden wird (siehe Abb. 16). Dagegen führt die Verwendung des hinteren Polyadenylierungssignals zur Expression einer *MGMT*-Transkriptvariante mit einem um 417 nt längeren 3'-UTR. Die lange *MGMT*-3'-UTR-Variante wird nur im Tumorgewebe exprimiert und ist in GBM, unabhängig vom *MGMT*-Promotormethylierungsstatus, mit einer verminderten *MGMT*-mRNA-Expression assoziiert (siehe Abb. 16 und Abb. 17). Die genauen Regulationsmechanismen einer alternativen Polyadenylierung sind noch nicht vollständig verstanden. Jedoch weisen einige Studien darauf hin, dass Cis-Kontrollelemente (z. B. U-, und GU-reiche Elemente) sowie Co-Faktoren (z. B. „Cleavage stimulation factor“ und „Cleavage and polyadenylation specificity factor“), die an der 3'-Prozessierung beteiligt sind, zur Verwendung alternativer Polyadenylierungssignale führen und dadurch die Entstehung von Transkriptvarianten mit unterschiedlichen 3'-UTR-Längen begünstigen könnten [39,42]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass in GBM Polyadenylierung-regulierende Faktoren differenziell exprimiert werden, wodurch in den Tumoren eine alternative Polyadenylierung hervorgerufen wird, die zur Expression der langen *MGMT*-3'-UTR-Variante führt.

Für Tumore wurde bislang gezeigt, dass sich Onkogene (z. B. IGF2BP1, Cyclin D1 und Cyclin D2) durch Verkürzung des 3'-UTRs einer Regulation durch miRNAs entziehen können, wodurch die Tumorigenese gefördert wird [61]. In der

vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass auch eine 3'-UTR-Verlängerung von MGMT zu einer erhöhten Malignität von Tumorzellen führen kann: Die lange MGMT-3'-UTR-Variante enthält mehr miRNA-Bindestellen als die kurze Transkriptvariante und ermöglicht somit eine Reduktion der MGMT-Expression durch miRNA-181d, miRNA-648 sowie miRNA-767-3p (siehe Abb. 20, Abb. 21 und Abb. 22). Die Ergebnisse zeigen, dass miR-181d und miRNA-767-3p zu einer Degradation der MGMT-mRNA führen, wohingegen miRNA-648 hauptsächlich die Translationseffizienz von MGMT reduziert (siehe Abb. 22). Diese MGMT-regulierenden miRNAs werden in GBM exprimiert, im Fall von miRNA-648 und miRNA-767-3p sogar mit einer im Vergleich zu Normalhirngewebe gesteigerten Expressionsrate (siehe Abb. 23), wodurch eine verminderte MGMT-mRNA-Expression in den Tumorproben erklärt werden kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen zudem, dass miRNA-181d, miRNA-648 sowie miRNA-767-3p durch Regulation der MGMT-Expression TMZ-vermittelte zytotoxische Effekte auf Gliomzellen erhöhen und somit zu einer potenziell besseren Ansprechrate der GBM-Patienten auf Radio-/Chemotherapie mit TMZ führen können (siehe Abb. 24).

Durch den in der vorliegenden Arbeit gefundenen posttranskriptionellen Regulationsmechanismus der MGMT-Expression könnten Befunde von Patienten erklärt werden, die trotz eines unmethylierten *MGMT*-Promotors eine geringe MGMT-Expression aufweisen [51]. Bei GBM-Patienten ist somit eine Therapieentscheidung zugunsten einer Chemotherapie nicht allein auf der Basis vom *MGMT*-Promotormethylierungsstatus möglich, sondern es müssen noch weitere MGMT-regulierende Faktoren, wie Histonmodifikationen, Transkriptionsfaktoren und die hier beschriebene alternative Polyadenylierung, berücksichtigt werden [47,100,52,49].

4. Zusammenfassung

Bei der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression spielt die alternative Verwendung von Spleißregionen und Polyadenylierungssignalen eine wichtige Rolle. Es ist bekannt, dass alternatives Spleißen sowie alternative Polyadenylierung zur Entstehung von mRNA-Isoformen mit verschiedenen 3'-UTR-Längen führen und sowohl die Transkriptstabilität als auch die Proteinexpression beeinflussen können: Kurze 3'-UTR-Varianten enthalten weniger miRNA-Bindestellen und sind somit der Regulation durch miRNAs weitgehend entzogen, während alternativ verlängerte 3'-UTRs mehr miRNA-Bindestellen besitzen und potenziell besser durch miRNAs reguliert werden. Die Relevanz dieser Mechanismen konnte in der vorliegenden Arbeit an zwei Beispielen unterschiedlicher klinischer Bereiche gezeigt werden:

Alternatives Spleißen des Glukokortikoidrezeptor (GR)-Transkripts führt zur Entstehung der mRNA-Transkriptvarianten GR α und GR β , die sich in der Länge ihrer exprimierten 3'-UTRs unterscheiden: Im Gegensatz zu GR β besteht die GR α -mRNA aus einem längeren 3'-UTR, der miRNA-124-Bindestellen aufweist. Eine miRNA-124-vermittelte Regulation der GR α -Expression führt zu einer Imbalance in der Expression von GR α und GR β und kann somit die Entstehung einer Glukokortikoid-Insensitivität septischer Patienten begünstigen.

In Glioblastomen führt die Verwendung einer alternativen Polyadenylierungssequenz zu einer längeren 3'-UTR-Variante des DNA-Reparaturenzyms O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT). Diese Variante enthält mehr miRNA-Bindestellen als die kurze 3'-UTR-Variante, was zu einer miRNA-vermittelten Reduktion der MGMT-Expression und zu einer verbesserten Ansprechrate der Gliomzellen auf alkylierende Chemotherapeutika führt.

5. Summary

The alternative usage of splicing sites and polyadenylation signals plays an important role in posttranscriptional regulation of gene expression. Recent reports indicate that alternative splicing as well as alternative polyadenylation result in multiple mRNA isoforms differing in their 3'-UTR lengths, thereby altering transcript stability and protein expression: Shorter 3'-UTR variants have been shown to possess less miRNA binding sites, thus circumventing miRNA targeting. In contrast, longer 3'-UTRs possess more miRNA binding sites, rendering them prone to miRNA regulation. The clinical impact of these mechanisms was evaluated in the current work based on two different clinical domains:

Two mRNA transcript variants of the glucocorticoid receptor (GR) transcript, GR α and GR β , which mainly differ in their 3'-UTRs length originate from alternative splicing events: The GR α -3'-UTR is much longer than GR β -3'-UTR and possess miRNA-124 binding sites. The miRNA-124 mediated regulation of GR α expression leads to an imbalanced expression of GR α and GR β , thereby potentially facilitating glucocorticoid insensitivity of septic patients.

In glioblastoma, alternative polyadenylation leads to the expression of an additional longer 3'-UTR variant of the DNA repair enzyme O⁶-Methylguanine-DNA-Methyltransferase (MGMT). MiRNA binding sites are predominantly located within this elongated 3'-UTR variant, thereby rendering MGMT prone to miRNA mediated suppression and enhancing the responsivity of glioma cells to alkylating chemotherapeutic agents.

6. Literaturverzeichnis

1. Adib-Conquy M, Cavaillon JM (2009) Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost* 101 (1):36-47
2. Agarwala SS, Kirkwood JM (2000) Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma. *Oncologist* 5 (2):144-151
3. Almawi WY, Melemedjian OK (2002) Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J Leukoc Biol* 71 (1):9-15
4. Annane D (2011) Corticosteroids for severe sepsis: an evidence-based guide for physicians. *Ann Intensive Care* 1 (1):7. doi:10.1186/2110-5820-1-7
5. Annane D, Sebille V, Bellissant E, Ger-Inf-05 Study G (2006) Effect of low doses of corticosteroids in septic shock patients with or without early acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 34 (1):22-30
6. Atsuta J, Plitt J, Bochner BS, Schleimer RP (1999) Inhibition of VCAM-1 expression in human bronchial epithelial cells by glucocorticoids. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20 (4):643-650
7. Avgeropoulos NG, Batchelor TT (1999) New treatment strategies for malignant gliomas. *Oncologist* 4 (3):209-224
8. Baer JC, Freeman AA, Newlands ES, Watson AJ, Rafferty JA, Margison GP (1993) Depletion of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase correlates with potentiation of temozolomide and CCNU toxicity in human tumour cells. *Br J Cancer* 67 (6):1299-1302
9. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116 (2):281-297

10. Batuman OA, Ferrero AP, Diaz A, Berger B, Pomerantz RJ (1994) Glucocorticoid-mediated inhibition of interleukin-2 receptor alpha and -beta subunit expression by human T cells. *Immunopharmacology* 27 (1):43-55
11. Black DL (2000) Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell* 103 (3):367-370
12. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101 (6):1644-1655
13. Braun CM, Huang SK, Bashian GG, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Essayan DM (1997) Corticosteroid modulation of human, antigen-specific Th1 and Th2 responses. *J Allergy Clin Immunol* 100 (3):400-407
14. Briegel J, Kellermann W, Forst H, Haller M, Bittl M, Hoffmann GE, Buchler M, Uhl W, Peter K (1994) Low-dose hydrocortisone infusion attenuates the systemic inflammatory response syndrome. The Phospholipase A2 Study Group. *Clin Investig* 72 (10):782-787
15. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436 (7051):740-744. doi:10.1038/nature03868
16. Chowdhury B, Tsokos CG, Krishnan S, Robertson J, Fisher CU, Warke RG, Warke VG, Nambiar MP, Tsokos GC (2005) Decreased stability and translation of T cell receptor zeta mRNA with an alternatively spliced 3'-untranslated region contribute to zeta chain down-regulation in patients with systemic lupus erythematosus. *J Biol Chem* 280 (19):18959-18966. doi:10.1074/jbc.M501048200

17. Chrousos GP (1995) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 332 (20):1351-1362. doi:10.1056/NEJM199505183322008
18. Colgan DF, Manley JL (1997) Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev* 11 (21):2755-2766
19. Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F, Weissmann G (1992) A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (21):9991-9995
20. Das A, Banik NL, Patel SJ, Ray SK (2004) Dexamethasone protected human glioblastoma U87MG cells from temozolomide induced apoptosis by maintaining Bax:Bcl-2 ratio and preventing proteolytic activities. *Mol Cancer* 3 (1):36. doi:10.1186/1476-4598-3-36
21. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, Levy MM, Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines C (2004) Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 32 (3):858-873
22. Derijk RH, Schaaf MJ, Turner G, Datson NA, Vreugdenhil E, Cidlowski J, de Kloet ER, Emery P, Sternberg EM, Detera-Wadleigh SD (2001) A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28 (11):2383-2388
23. Di Giammartino DC, Nishida K, Manley JL (2011) Mechanisms and consequences of alternative polyadenylation. *Mol Cell* 43 (6):853-866. doi:10.1016/j.molcel.2011.08.017

24. Edwalds-Gilbert G, Veraldi KL, Milcarek C (1997) Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Res* 25 (13):2547-2561
25. Everhard S, Tost J, El Abdalaoui H, Criniere E, Busato F, Marie Y, Gut IG, Sanson M, Mokhtari K, Laigle-Donadey F, Hoang-Xuan K, Delattre JY, Thillet J (2009) Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. *Neuro Oncol* 11 (4):348-356. doi:10.1215/15228517-2009-001
26. Franchimont D, Louis E, Dewe W, Martens H, Vrindts-Gevaert Y, De Groote D, Belaiche J, Geenen V (1998) Effects of dexamethasone on the profile of cytokine secretion in human whole blood cell cultures. *Regul Pept* 73 (1):59-65
27. Gerson SL, Trey JE, Miller K, Berger NA (1986) Comparison of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat and mouse tissues. *Carcinogenesis* 7 (5):745-749
28. Goleva E, Li LB, Eves PT, Strand MJ, Martin RJ, Leung DY (2006) Increased glucocorticoid receptor beta alters steroid response in glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 173 (6):607-616. doi:10.1164/rccm.200507-1046OC
29. Graber JH, Cantor CR, Mohr SC, Smith TF (1999) In silico detection of control signals: mRNA 3'-end-processing sequences in diverse species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (24):14055-14060
30. Gross KL, Lu NZ, Cidlowski JA (2009) Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance. *Mol Cell Endocrinol* 300 (1-2):7-16. doi:10.1016/j.mce.2008.10.001
31. Gustot T (2011) Multiple organ failure in sepsis: prognosis and role of systemic inflammatory response. *Curr Opin Crit Care* 17 (2):153-159. doi:10.1097/MCC.0b013e328344b446

32. Haarman EG, Kaspers GJ, Pieters R, Rottier MM, Veerman AJ (2004) Glucocorticoid receptor alpha, beta and gamma expression vs in vitro glucocorticoid resistance in childhood leukemia. *Leukemia* 18 (3):530-537. doi:10.1038/sj.leu.2403225
33. He L, Hannon GJ (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5 (7):522-531. doi:10.1038/nrg1379
34. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352 (10):997-1003. doi:10.1056/NEJMoa043331
35. Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR (2008) Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol* 26 (25):4189-4199. doi:10.1200/JCO.2007.11.5964
36. Helfer S, Schott J, Stoecklin G, Forstemann K (2012) AU-rich element-mediated mRNA decay can occur independently of the miRNA machinery in mouse embryonic fibroblasts and *Drosophila* S2-cells. *PLoS One* 7 (1):e28907. doi:10.1371/journal.pone.0028907
37. Hillmann AG, Ramdas J, Multanen K, Norman MR, Harmon JM (2000) Glucocorticoid receptor gene mutations in leukemic cells acquired in vitro and in vivo. *Cancer Res* 60 (7):2056-2062
38. Hotchkiss RS, Karl IE (2003) The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 348 (2):138-150. doi:10.1056/NEJMra021333

39. Hu J, Lutz CS, Wilusz J, Tian B (2005) Bioinformatic identification of candidate cis-regulatory elements involved in human mRNA polyadenylation. *RNA* 11 (10):1485-1493. doi:10.1261/rna.2107305
40. Hughes TA (2006) Regulation of gene expression by alternative untranslated regions. *Trends Genet* 22 (3):119-122. doi:10.1016/j.tig.2006.01.001
41. Irving JA, Minto L, Bailey S, Hall AG (2005) Loss of heterozygosity and somatic mutations of the glucocorticoid receptor gene are rarely found at relapse in pediatric acute lymphoblastic leukemia but may occur in a subpopulation early in the disease course. *Cancer Res* 65 (21):9712-9718. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1227
42. Ji Z, Tian B (2009) Reprogramming of 3' untranslated regions of mRNAs by alternative polyadenylation in generation of pluripotent stem cells from different cell types. *PloS One* 4 (12):e8419. doi:10.1371/journal.pone.0008419
43. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS (2004) Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2 (11):e363. doi:10.1371/journal.pbio.0020363
44. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP (2007) MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair* 6 (8):1079-1099. doi:10.1016/j.dnarep.2007.03.008
45. Kaina B, Fritz G, Mitra S, Coquerelle T (1991) Transfection and expression of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents. *Carcinogenesis* 12 (10):1857-1867
46. Keh D, Boehnke T, Weber-Cartens S, Schulz C, Ahlers O, Bercker S, Volk HD, Doecke WD, Falke KJ, Gerlach H (2003) Immunologic and hemodynamic effects of "low-dose" hydrocortisone in septic shock: a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover study. *Am J Respir Crit Care Med* 167 (4):512-520. doi:10.1164/rccm.200205-446OC

47. Kitange GJ, Mladek AC, Carlson BL, Schroeder MA, Pokorny JL, Cen L, Decker PA, Wu W, Lomberk GA, Gupta SK, Urrutia RA, Sarkaria JN (2012) Inhibition of histone deacetylation potentiates the evolution of acquired temozolomide resistance linked to MGMT upregulation in glioblastoma xenografts. *Clin Cancer Res* 18 (15):4070-4079. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0560
48. Koga Y, Matsuzaki A, Suminoe A, Hattori H, Kanemitsu S, Hara T (2005) Differential mRNA expression of glucocorticoid receptor alpha and beta is associated with glucocorticoid sensitivity of acute lymphoblastic leukemia in children. *Pediatr Blood Cancer* 45 (2):121-127. doi:10.1002/pbc.20308
49. Kohsaka S, Wang L, Yachi K, Mahabir R, Narita T, Itoh T, Tanino M, Kimura T, Nishihara H, Tanaka S (2012) STAT3 inhibition overcomes temozolomide resistance in glioblastoma by downregulating MGMT expression. *Mol Cancer Ther* 11 (6):1289-1299. doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0801
50. Kreth S, Heyn J, Grau S, Kretzschmar HA, Egensperger R, Kreth FW (2010) Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in human glioma. *Neuro Oncol* 12 (6):570-579. doi:10.1093/neuonc/nop072
51. Kreth S, Thon N, Eigenbrod S, Lutz J, Ledderose C, Egensperger R, Tonn JC, Kretzschmar HA, Hinske LC, Kreth FW (2011) O-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) mRNA expression predicts outcome in malignant glioma independent of MGMT promoter methylation. *PloS One* 6 (2):e17156. doi:10.1371/journal.pone.0017156
52. Lavon I, Fuchs D, Zrihan D, Efroni G, Zelikovitch B, Fellig Y, Siegal T (2007) Novel mechanism whereby nuclear factor kappaB mediates DNA damage repair through regulation of O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase. *Cancer Res* 67 (18):8952-8959. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3820

53. Ledderose C, Heyn J, Limbeck E, Kreth S (2011) Selection of reliable reference genes for quantitative real-time PCR in human T cells and neutrophils. *BMC Res Notes* 4:427. doi:10.1186/1756-0500-4-427
54. Leung DY, Hamid Q, Vottero A, Szeffler SJ, Surs W, Minshall E, Chrousos GP, Klemm DJ (1997) Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta. *J Exp Med* 186 (9):1567-1574
55. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120 (1):15-20. doi:10.1016/j.cell.2004.12.035
56. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115 (7):787-798
57. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83 (6):835-839
58. Maniatakis E, Mourelatos Z (2005) A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* 19 (24):2979-2990. doi:10.1101/gad.1384005
59. Marik PE (2009) Critical illness-related corticosteroid insufficiency. *Chest* 135 (1):181-193. doi:10.1378/chest.08-1149
60. Martinez-Arguelles DB, Papadopoulos V (2010) Epigenetic regulation of the expression of genes involved in steroid hormone biosynthesis and action. *Steroids* 75 (7):467-476. doi:10.1016/j.steroids.2010.02.004
61. Mayr C, Bartel DP (2009) Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell* 138 (4):673-684. doi:10.1016/j.cell.2009.06.016

62. Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G (2002) Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol* 3 (3):REVIEWS0004
63. Miranda KC, Huynh T, Tay Y, Ang YS, Tam WL, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I (2006) A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 126 (6):1203-1217
64. Modrek B, Resch A, Grasso C, Lee C (2001) Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Res* 29 (13):2850-2859
65. Oakley RH, Cidlowski JA (2011) Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem* 286 (5):3177-3184. doi:10.1074/jbc.R110.179325
66. Oakley RH, Jewell CM, Yudit MR, Bofetiado DM, Cidlowski JA (1999) The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem* 274 (39):27857-27866
67. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schuler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lutolf UM, Kleihues P (2004) Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 64 (19):6892-6899. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1337
68. Ohgaki H, Kleihues P (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109 (1):93-108. doi:10.1007/s00401-005-0991-y
69. Ohgaki H, Kleihues P (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170 (5):1445-1453. doi:10.2353/ajpath.2007.070011

70. Ohgaki H, Kleihues P (2013) The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res* 19 (4):764-772. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3002
71. Orii F, Ashida T, Nomura M, Maemoto A, Fujiki T, Ayabe T, Imai S, Saitoh Y, Kohgo Y (2002) Quantitative analysis for human glucocorticoid receptor alpha/beta mRNA in IBD. *Biochem Biophys Res Commun* 296 (5):1286-1294
72. Rao JS (2003) Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer* 3 (7):489-501. doi:10.1038/nrc1121
73. Rhen T, Cidlowski JA (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 353 (16):1711-1723. doi:10.1056/NEJMra050541
74. Ristimaki A, Narko K, Hla T (1996) Down-regulation of cytokine-induced cyclooxygenase-2 transcript isoforms by dexamethasone: evidence for post-transcriptional regulation. *Biochem J* 318 (Pt 1):325-331
75. Rivas FV, Tolia NH, Song JJ, Aragon JP, Liu J, Hannon GJ, Joshua-Tor L (2005) Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol* 12 (4):340-349. doi:10.1038/nsmb918
76. Robb GB, Rana TM (2007) RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Mol Cell* 26 (4):523-537. doi:10.1016/j.molcel.2007.04.016
77. Russcher H, Smit P, van den Akker EL, van Rossum EF, Brinkmann AO, de Jong FH, Lamberts SW, Koper JW (2005) Two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene directly affect glucocorticoid-regulated gene expression. *J Clin Endocrinol Metab* 90 (10):5804-5810. doi:10.1210/jc.2005-0646

78. Sandberg R, Neilson JR, Sarma A, Sharp PA, Burge CB (2008) Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science* 320 (5883):1643-1647
79. Sellers RS, Luchin AI, Richard V, Brena RM, Lima D, Rosol TJ (2004) Alternative splicing of parathyroid hormone-related protein mRNA: expression and stability. *J Mol Endocrinol* 33 (1):227-241
80. Shahidi H, Vottero A, Stratakis CA, Taymans SE, Karl M, Longui CA, Chrousos GP, Daughaday WH, Gregory SA, Plate JM (1999) Imbalanced expression of the glucocorticoid receptor isoforms in cultured lymphocytes from a patient with systemic glucocorticoid resistance and chronic lymphocytic leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* 254 (3):559-565. doi:10.1006/bbrc.1998.9980
81. Smith KA (1988) Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 240 (4856):1169-1176
82. Soifer HS, Rossi JJ, Saetrom P (2007) MicroRNAs in disease and potential therapeutic applications. *Mol Ther* 15 (12):2070-2079. doi:10.1038/sj.mt.6300311
83. Sprung CL, Caralis PV, Marcial EH, Pierce M, Gelbard MA, Long WM, Duncan RC, Tendler MD, Karpf M (1984) The effects of high-dose corticosteroids in patients with septic shock. A prospective, controlled study. *N Engl J Med* 311 (18):1137-1143. doi:10.1056/NEJM198411013111801
84. Srivenugopal KS, Yuan XH, Friedman HS, Ali-Osman F (1996) Ubiquitination-dependent proteolysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O6-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochemistry* 35 (4):1328-1334. doi:10.1021/bi9518205
85. Staley JP, Guthrie C (1998) Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92 (3):315-326

86. Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM (2005) Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* 123 (6):1133-1146

87. Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remick DG (2011) The pathogenesis of sepsis. *Annu Rev Pathol* 6:19-48. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130327

88. Strickland I, Kisich K, Hauk PJ, Vottero A, Chrousos GP, Klemm DJ, Leung DY (2001) High constitutive glucocorticoid receptor beta in human neutrophils enables them to reduce their spontaneous rate of cell death in response to corticosteroids. *J Exp Med* 193 (5):585-593

89. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO, European Organisation for R, Treatment of Cancer Brain T, Radiotherapy G, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials G (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352 (10):987-996. doi:10.1056/NEJMoa043330

90. Tissing WJ, Lauten M, Meijerink JP, den Boer ML, Koper JW, Sonneveld P, Pieters R (2005) Expression of the glucocorticoid receptor and its isoforms in relation to glucocorticoid resistance in childhood acute lymphocytic leukemia. *Haematologica* 90 (9):1279-1281

91. van Rossum EF, Koper JW, Huizenga NA, Uitterlinden AG, Janssen JA, Brinkmann AO, Grobbee DE, de Jong FH, van Duyn CM, Pols HA, Lamberts SW (2002) A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes* 51 (10):3128-3134

92. von Deimling A, Korshunov A, Hartmann C (2011) The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations. *Brain Pathol* 21 (1):74-87. doi:10.1111/j.1750-3639.2010.00454.x
93. Wang X, El Naqa IM (2008) Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals. *Bioinformatics* 24 (3):325-332. doi:btm595
94. Watts GS, Pieper RO, Costello JF, Peng YM, Dalton WS, Futscher BW (1997) Methylation of discrete regions of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene. *Mol Cell Biol* 17 (9):5612-5619
95. Webster JC, Oakley RH, Jewell CM, Cidlowski JA (2001) Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (12):6865-6870. doi:10.1073/pnas.121455098
96. Webster JI, Sternberg EM (2004) Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, glucocorticoids and glucocorticoid receptors in toxic sequelae of exposure to bacterial and viral products. *J Endocrinol* 181 (2):207-221
97. Wen PY, Kesari S (2008) Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 359 (5):492-507. doi:10.1056/NEJMra0708126
98. Wiersinga WJ (2011) Current insights in sepsis: from pathogenesis to new treatment targets. *Curr Opin Crit Care* 17 (5):480-486. doi:10.1097/MCC.0b013e32834a4aeb
99. Zhao W, Blagev D, Pollack JL, Erle DJ (2011) Toward a systematic understanding of mRNA 3' untranslated regions. *Proc Am Thorac Soc* 8 (2):163-166. doi:10.1513/pats.201007-054MS

100. Zhao W, Soejima H, Higashimoto K, Nakagawachi T, Urano T, Kudo S, Matsukura S, Matsuo S, Joh K, Mukai T (2005) 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* 137 (3):431-440. doi:10.1093/jb/mvi048

7. Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Cell Culture Collection
bp	Basenpaar
CARS	Anti-inflammatory Response-Syndrom
CP	Crossing-Point bei qPCR
E. coli	Escherichia coli
DMSO	Dimethylsulfoxid
Fluc	Firefly-Luciferase
GBM	Glioblastom
GR	Glukokortikoidrezeptor
GR α	Glukokortikoidrezeptor α -Form
GR β	Glukokortikoidrezeptor β -Form
kDa	Kilodalton
H ₂ O _{dd}	Zweifach deionisiertes Wasser
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HC	Hydrokortison
M	Molar
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
miRNA	microRNA
NEAA	Non-Essential Amino Acids
nt	Nukleotid
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
premiR	Pre-miR miRNA Precursor Molecules
R	Korrelationskoeffizient
Rluc	Renilla-Luciferase
RLM-RACE	RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends
qPCR	Quantitative Real-Time Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion
rpm	Rounds per minute
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler

Th1	T-Helfer-Zellen Typ 1
Th2	T-Helfer-Zellen Typ 2
TMZ	Temozolomid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymaktivität [Unit]
UPL	Universal Probe Library
3'-UTR	3'-untranslatierte Region

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der miRNA-Prozessierung	2
Abb. 2: Schematische Darstellung des Aufbaus von mRNAs.....	2
Abb. 3: Alternatives Spleißen führt zu zwei GR-Isoformen	6
Abb. 4: Schematische Darstellung des GR-Signalweges	7
Abb. 5: DNA-Reparaturmechanismus von MGMT	10
Abb. 6: Kaplan-Meier-Überlebenskurven von GBM-Patienten stratifiziert nach dem <i>MGMT</i> -Promotormethylierungsstatus	11
Abb. 7: Expression von GR α und GR β in nativen, stimulierten und Hydrokortison-behandelten humanen T-Zellen	42
Abb. 8: Transfektionseffizienz primärer T-Lymphozyten mit siRNA.....	43
Abb. 9: GR β -Knockdown verstärkt Hydrokortison-vermittelte Effekte.....	44
Abb. 10: Schematische Darstellung der Lokalisation von miRNA-124-Bindestellen im GR α -3'-UTR	45
Abb. 11: Direkte Bindung von miRNA-124 an GR α -3'-UTR.....	46
Abb. 12: MiRNA-124 beeinflusst die GR α -Expression in humanen T-Zellen.....	47
Abb. 13: Expression von miRNA-124 in humanen T-Zellen.....	48
Abb. 14: Expression von GR α , GR β und miRNA-124 in T-Zellen von Sepsis-Patienten.....	49

Abb. 15: Schematische Darstellung des miRNA-124-vermittelten negativen Rückkoppelungsmechanismus	51
Abb. 16: Identifikation von zwei Polyadenylierungsstellen im MGMT-3'-UTR.....	53
Abb. 17: Expression der MGMT-3'-UTR-Varianten in GBM-Biopsaten.....	54
Abb. 18: Reduktion der Proteinexpression durch 3'-UTR-Verlängerung	55
Abb. 19: Reduktion der mRNA-Stabilität und der Proteinexpression durch 3'-UTR-Verlängerung.....	56
Abb. 20: Schematische Darstellung der miRNA-Bindestellen in den MGMT-3'-UTR-Varianten.....	57
Abb. 21: Bindung von miRNAs an die MGMT-3'-UTR-Varianten.....	58
Abb. 22: MiRNA-vermittelte Regulation der MGMT-Expression	59
Abb. 23: Expression der MGMT-regulierenden miRNAs in GBM-Biopsaten	60
Abb. 24: Einfluss der MGMT-regulierenden miRNAs auf die Zellviabilität nach TMZ-Gabe.....	61

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primer	21
Tabelle 2: Verwendete siRNA gegen GR β	22
Tabelle 3: Verwendete Erst- und Zweitantikörper für Westernblot-Analysen.....	23
Tabelle 4: Verwendete Zellen und Zelllinien.....	24
Tabelle 5: Verwendete Elektroporationsparameter.....	31
Tabelle 6: CP-Wert und relative mRNA-Expression von GR α und GR β in unstimulierten T-Zellen	41

10. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Promotionsbetreuerin Frau Priv. Doz. Dr. Dr. Simone Kreth für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für die sehr engagierte persönliche und fachliche Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Zwißler, der mir ermöglichte meine Doktorarbeit an der Klinik für Anaesthesiologie durchzuführen.

Ich bedanke mich bei der Klinik für Neurochirurgie, im Besonderen bei Herrn Prof. Dr. Friedrich-Wilhelm Kreth und Herrn Dr. Niklas Thon, für die Bereitstellung der Proben sowie der erfolgreichen Zusammenarbeit.

Mein Dank geht auch an Universität Bayern eV für die finanzielle Unterstützung der Graduiertenförderung nach dem Bayerischen Elitförderungsgesetz.

Ein großes Dankeschön geht an alle Laborkollegen für die freundschaftliche und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein aufrichtiger Dank gilt Carola Ledderose, Stefanie Schütz, Patrick Möhnle, Christian Hinske, Gabriele Gröger, Jessica Rink, Samra Alijagic, Marco Gäbler und Max Hübner, die mir während meiner Doktorarbeitszeit bei praktischen und theoretischen Fragestellungen hilfsbereit zur Seite standen. Ich bedanke mich bei euch für die schöne Zeit im Labor!

Sehr herzlich bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meiner Studiums- und Doktorarbeitszeit begleitet haben und immer für mich da sind.