

Aus der Klinik für Anaesthesiologie
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Herr Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler

Charakterisierung der Rolle der microRNA-93 als Immunmodulator im Glioblastom

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

vorgelegt von
Nicholas Möllhoff
aus Limassol

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin: Prof. Dr. Dr. S. Kreth

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Uwe Ködel
PD Dr. Florence Bareyre
Prof. Dr. Lars Lindner

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. Max Hübner

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 30.07.2020

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Charakterisierung der Rolle der microRNA-93 als Immunmodulator im Glioblastom“ 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.

München, 14.08.2020

Nicholas Möllhoff

Meinen Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Glioblastoma Multiforme	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Pathologie	1
1.1.3 Klinische Symptomatik und Diagnostik	2
1.1.4 Therapie	2
1.2 Inflammation und Hypoxie im Rahmen der Pathophysiologie des GBM	3
1.3 MicroRNAs	4
1.3.1 Immuno-miR-93	6
2 Fragestellung	8
3 Material	9
3.1 Reagenzien	9
3.2 Kits und Assays	12
3.3 Medien und Puffer	13
3.4 Verbrauchsmaterialien	14
3.5 Geräte	16
3.6 Oligonukleotide	17
4 Methoden	20
4.1 Zellkultur	20
4.1.1 Passagieren von Zellen	20
4.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	21
4.1.3 Gewinnung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes	21
4.1.4 Humane Glioblastom Gewebeproben	22
4.1.5 Isolation von Primärzellkulturen aus Gewebepräparaten	22
4.1.6 Stimulation von Zellen mit IL-1 β und mit Überstand stimulierter PBMCs	23
4.1.7 Inkubation in Hypoxie	23
4.2 Molekularbiologische Methoden	23
4.2.1 Transiente Transfektion mittels Elektroporation	23
4.2.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz	24
4.2.3 DNA Extraktion	25
4.2.4 RNA-Extraktion und DNase-Verdau	25
4.2.4.1 RNA-Extraktion mittels RNAqueous Kit	25

4.2.4.2	RNA-Extraktion mittels mirVana miRNA Isolations Kit	26
4.2.4.3	DNase Verdau	26
4.2.5	Reverse Transkription	27
4.2.6	Real-Time-PCR	28
4.2.6.1	Quantifizierung von mRNA inflammatorischer Gene	28
4.2.6.2	Quantifizierung von miRNAs	29
4.2.7	MicroArray	29
4.3	Klonierung von 3'UTR-Sequenzen in den psiCHECK™-2 Vektor	30
4.3.1	qPCR mit genomischer DNA	30
4.3.2	Analytische Gelelektrophorese	31
4.3.3	Ligation in den Topoisomerase-Vektor und Transformation in E.coli	31
4.3.4	Plasmidpräparation	32
4.3.5	Restriktionsverdau	33
4.3.6	Präparative Gelelektrophorese und Gelaufreinigung	33
4.3.7	Ligation in den psiCHECK™-2 Vektor	34
4.3.8	DNA-Sequenzierung	34
4.4	Dualer Luciferase-Reportergen-Assay	34
4.5	Gerichtete Mutagenese der miR-93 Bindestellen	35
4.6	Proteinbiochemische Methoden	37
4.6.1	Proteinextraktion und Proteinbestimmung mittels BCA-Assay	37
4.6.2	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	37
4.6.3	Multiplex Protein Assay	38
4.6.4	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese und Western Blot	39
4.7	Methoden zur Beurteilung der Zellmorphologie	41
4.7.1	Migrationsassay	41
4.7.2	Tube Formation Assay	41
4.8	Statistische und bioinformatische Methoden	41
5	Ergebnisse	43
5.1	Eine proinflammatorische Mikroumgebung führt zur Induktion einer inflammatorischen Genexpression in GBM-Zelllinien	43
5.2	MiR-93 wird in GBM-Biopsaten und Primärzelllinien vermindert exprimiert ...	46
5.3	MiR-93 Re-Expression reprimiert die tumorinduzierte Zytokinsekretion in GBM Zelllinien	48
5.4	Experimentelle Validierung potentieller miR-93 Zielgene identifiziert LIF, IL-6, G-CSF, Map3K2 und HIF-1 α als neue miR-93 Targets	53
5.5	Doppelknockdown von HIF-1 α und Map3K2 führt zur Herunterregulation von COX2 und CXCL5	54

5.6	Der regulatorische Effekt der miR-93 beruht auf der Interaktion mit zwei Bindestellen im Map3K2 3'UTR.....	56
5.7	Der regulatorische Effekt der miR-93 beruht auf der Interaktion mit einer Bindestelle im HIF-1 α 3'UTR.....	60
5.8	MiR-93 reduziert die U87 Zellmigration und hindert die Angiogenese in Endothelzellen	61
6	Diskussion	63
7	Zusammenfassung.....	69
8	Summary	70
9	Veröffentlichungen.....	71
10	Literaturverzeichnis	72
11	Abkürzungsverzeichnis	82
12	Abbildungsverzeichnis	85
13	Tabellenverzeichnis	86
14	Danksagung	87

1 Einleitung

1.1 Glioblastoma Multiforme

1.1.1 Epidemiologie

Das Glioblastoma Multiforme (GBM) gehört zu den aggressivsten Tumorentitäten. Etwa 25 % aller hirneigenen Tumoren und 60 % aller astrozytären malignen Gliome sind GBMs [1]. Die Inzidenz beträgt ca. 3 Fälle pro 100.000 Einwohner [2]. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren [3]. Männer sind mit einem Verhältnis von 1.5:1 häufiger betroffen als Frauen [4].

1.1.2 Pathologie

In der Entstehung des GBMs unterscheidet man primäre von sekundären Tumoren. Primäre GBMs gehen *de novo* vom astrozytären Epithel aus, sekundäre entstehen infolge einer malignen Transformation aus niedrigmaligneren Gliomen [5,6]. GBMs zeichnen sich durch aggressive Tumorprogression und Umgebungsinfiltration aus [7]. Sie treten vorwiegend in der Substantia alba der Großhirnhemisphären auf. Neben dem Cortex können auch die Basalganglien infiltriert sein. Die Ausbreitung des Tumors kann über mehrere Hirnlappen, oder über das Corpus callosum, als sogenanntes Schmetterlingsgliom, in die kontralaterale Hemisphäre reichen [8,9]. Durch das rapide Tumorstadium kommt es zur Ausbildung eines fragilen Gefäßnetzwerks, zu Gefäßblutungen aus funktionseingeschränkten Gefäßen und zu nekrotischen Verfallsprozessen [10-12]. Im histologischen Schnittbild ist eine inhomogene, multifforme Erscheinung mit entdifferenziertem Gewebe, vielen Mitosen, Nekrosen, und Endothelproliferationen charakteristisch [1]. Häufig wird die Ausbildung eines prognostisch ungünstigen Ödems beobachtet, welches in einer Hemisphärenschwellung resultieren kann [13].

Molekulare Biomarker und genetische Mutationsprofile nehmen in der Diagnostik und bei individuellen Therapiekonzepten eine entscheidende Rolle ein [14]. Genetische Alterationen tragen wesentlich zur Pathogenität des GBMs bei. Die Aktivierung von Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressoren steigert das onkogene Tumorstadium [15]. Insbesondere der Methylierungsstatus des O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) Promoters hat dabei eine große klinische Relevanz [8]. Die MGMT ist ein DNA-Reparaturprotein, das Alkylgruppen von Guanin entfernt und genetische Mutationen durch die Einleitung von Apoptose verhindert [16]. Im Umkehrschluss führt dies zu einer verminderten

Sensibilität des entarteten Gewebes auf alkylierende Chemotherapeutika wie Temozolomid. Eine Aktivitätsminderung des MGMT Promoters durch Hypermethylierung, auch epigenetisches Silencing genannt, führt zu einer signifikanten Verbesserung der Überlebenszeit unter Chemotherapie [17-20]. Ein solcher Methylierungsstatus findet sich in 40-50% der betroffenen GBM Patienten [17] und wird in der Klinik als prädiktiver und prognostischer Biomarker bestimmt.

1.1.3 Klinische Symptomatik und Diagnostik

Das GBM zeigt keine charakteristische Klinik. Als intrakranielle Raumforderungen wird es meist symptomatisch, wenn ein bestimmtes Größenvolumen überschritten wurde. Die Verdrängung von Liquor und Blutvolumen führt zur Erhöhung des intrakraniellen Drucks. Das Hirngewebe wird gegen die starre, knöcherne Schädelhöhle und die Septen der Meningen gedrückt und somit komprimiert. Diese Kompression kann schließlich, je nach betroffenem Hirnareal, zu Funktionsstörungen, zur Bewusstlosigkeit und letztendlich zum Tod des Patienten führen. Durch das schnelle Tumorstadium ist auch eine akute Symptomatik, bis hin zu insultartiger Verschlechterung des Patientenbefindens möglich. Zu den Allgemeinsymptomen gehören die klassischen Hirndruckzeichen: Kopfschmerzen, Erbrechen, Übelkeit und eine Stauungspapille. Es kann zu epileptischen Anfällen, Wesensveränderungen, Verhaltensstörungen und Bewusstseinsstörungen kommen [1,21,22].

In der Diagnostik findet die kontrastmittelunterstützte Computer- und Magnetresonanztomographie Anwendung. GBMs zeigen girlandenförmige Kontrastmittelaufnahme mit perifokalem Ödem um eine zentrale Nekrose. Das Tumorgewebe erscheint inhomogen. Die Abgrenzung vom gesunden Gewebe ist häufig schwierig [8,23]. Die Verdachtsdiagnose eines GBM wird durch histopathologische Gewebeuntersuchung gesichert [24].

1.1.4 Therapie

Eine kurative Behandlung des GBMs existiert bislang nicht. Die Therapie der Wahl ist die radikale mikrochirurgische Tumorsektion mit nachfolgender Radiochemotherapie [25]. Trotz fluoreszenzgestützter neurochirurgischer Resektionsverfahren, die eine größtmögliche Resektion des kontrastmittelaufnehmenden Tumors ermöglichen [26,27], ist eine komplette Entfernung nur in etwa der Hälfte der Fälle möglich. Stereotaktische Tumorbiopsien werden bei nicht resektablen Tumoren angewandt und sind der inkompletten Resektion vorzuziehen [28]. Durch Radiochemotherapie kann die Überlebenszeit, insbesondere bei Patienten mit

methyliertem MGMT Status, wesentlich verbessert werden [29]. Die mediane Überlebenszeit beträgt 15 Monate [22]. Chirurgische, radiologische und chemotherapeutische Maßnahmen zur Tumorreduktion müssen vermehrter interventionsbedingter Morbidität und Mortalität gegenübergestellt werden [30,31]. Häufig entstehen nach Tumorresektion Rezidive. Weitere Therapiemöglichkeiten sind in diesen Fällen stark begrenzt [32]. Da effektive Behandlungsstrategien weiterhin fehlen, treten neue Therapieansätze mit Fokus auf tumorimmunologische Prozesse zur Überlebensverbesserung zunehmend in den Vordergrund [21,33-35].

1.2 Inflammation und Hypoxie im Rahmen der Pathophysiologie des GBM

Inflammation wird definiert als therapeutische, sich selbst-limitierende Immunreaktion des Körpers auf pathogene Stimuli [36]. Durch inadäquates Abklingen der Inflammation oder eine fehlgeleitete Immunantwort kommt es zu chronisch-entzündlichen Prozessen. Diese fördern über maligne Zellmutationen die Entstehung von Tumoren [37-39]. Insbesondere für Kolon-, Leberzell-, oder Ösophaguskarzinome kann die sogenannte extrinsische Inflammation ursächlich sein [40-43].

Im Gegensatz dazu wird die von den Tumorzellen selbst induzierte Inflammation als intrinsische Inflammation bezeichnet. Beispielsweise führt die mutationsbedingte Deregulation von Transkriptionsfaktoren wie nuclear factor- κ B (NF- κ B), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) und hypoxia-inducible-factor-1 α (HIF-1 α) in Tumorzellen zur inflammatorischen Genexpression [44-46]. Als Konsequenz entsteht eine gesteigerte Tumorigenität mit Verbesserung von Überleben, Proliferation, Angiogenese und Invasivität der Tumorzellen [39,47-49].

Diese Pathomechanismen werden auch im GBM beobachtet [38,50,51]. Die Tumorzellen proliferieren in einer vielschichtigen und hochkomplexen inflammatorischen Mikroumgebung, welche maßgeblich auf die Sekretion von Inflammediatoren durch Immuneffektorzellen des angeborenen Immunsystems und tumorinfiltrierende Leukozyten zurückzuführen ist [52]. Interleukin- (IL-) 1 ist dabei der zentrale Neuroinflammationsmediator. Seine Überexpression führt zu einer systemischen inflammatorischen Reaktion. Die Aktivierung der IL-1 Signalkaskade führt zur Rekrutierung von inflammatorischen Mikrogliazellen, Leukozyten und Gefäßendothelzellen und aktiviert den NF- κ B Signalweg [53,54]. NF- κ B spielt als Transkriptionsfaktor für immunologische und inflammatorische Gene in der Entwicklung und Progression vieler Tumoren eine Rolle [55]. Gleichzeitig kommt es im GBM zu einer Paralyse des adaptiven Immunsystems. Immunsuppressive regulatorische T-Zellen werden vermehrt rekrutiert und die CD8-Zytotoxizität abgeschwächt [56,57]. Dadurch

wird ein adäquater antitumorigener Effekt verhindert [58]. Das Ungleichgewicht aus Inflammation und Immunparalyse trägt somit im GBM wesentlich zum aggressiven Tumorphänotyp bei.

Das aggressive Zellwachstum verstärkt die inflammatorische Mikroumgebung des Tumors noch durch einen weiteren Mechanismus. Durch den Mangel an adäquater Blutversorgung entsteht ein hypoxisches Tumormilieu [59-61]. Die Hypoxie führt schließlich auf molekularer Ebene über den Transkriptionsfaktor HIF-1 zu einer Amplifikation der Inflammation. Bei Sauerstoffmangel kommt es zu einer Stabilisierung des Transkriptionsfaktors. Als Folge werden Zielgene mit spezifischer „hypoxia response element“ (HRE) –Sequenz am Promotor induziert [62]. Die Aktivierung von HIF-1 erhöht so beispielsweise die Produktion von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [63] und bedingt eine vermehrte Ausschüttung von inflammatorischen Wachstumsfaktoren und Zytokinen [64]. Zusätzlich exprimieren die sogenannten pseudopalisaden-bildenden Zellen, die sich in hypoxischen Tumornekrosezonen befinden, hohe Konzentrationen von IL-8. IL-8 wiederum ist ein starker Induktor der Neovaskularisation und Progression im GBM [65].

Zusammengefasst unterstreichen aktuelle Studien die zentrale Bedeutung von Hypoxie und Inflammation auf tumorigene Eigenschaften der GBM Zellen. Durch wesentliche Schnittstellen zwischen den beiden Signalwegen kommt es sogar zu einer Amplifikation ihrer jeweiligen Wirkung [46,61,66-70]. Auf der Suche nach therapeutischen Ansatzpunkten gelangen Mechanismen zur Inhibition dieser starken inflammatorischen Tumorzellstimulation im GBM zunehmend in den Fokus. In diesem Zusammenhang wird die Funktion von microRNAs (miRNAs, miR-) als antiinflammatorische Tumorsuppressoren untersucht.

1.3 MicroRNAs

MicroRNAs sind 19-23 Nukleotid (nt) lange, hoch konservierte, nicht codierende RNAs, die auf posttranskriptionaler Ebene Zielgene nach dem Wirkprinzip der RNA-Interferenz regulieren [71]. Mehr als die Hälfte des Transkriptom steht unter dem Einfluss post-transkriptioneller miRNA Regulation [71]. Diese beruht auf der Bindung an die 3'-untranslatierte Region (3'UTR) der messenger RNA (mRNA) von Zielgenen. Hierdurch wird die Initiation der Translation inhibiert oder die Degradation der mRNA herbeigeführt [72,73]. Da miRNAs auch nur partiell komplementäre mRNA Sequenzen binden können, sind zahlreiche potenzielle Genregulationen möglich und funktionelle miRNA-mRNA Interaktionen nicht hundertprozentig vorauszusagen [71,74].

Reife miRNAs entstehen anhand der in Abb.1 schematisch dargestellten Prozessierungsschritte. Die RNA Polymerasen II und III katalysieren die Transkription der primary microRNA (pri-miRNA). Sie ist mehrere hundert Kilobasen (kb) lang und besitzt an ihrem 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz sowie an ihrem 5'-Ende ein 7-Methylguanosin-Cap. Durch unvollständige, komplementäre Basenpaarung kommt es zu einer doppelsträngigen Schleifenform. Noch im Nukleus der Zelle werden pri-miRNAs durch den Mikroprozessor-Komplex, bestehend aus der doppelstrangspezifischen RNA Ribonuklease Drosha und dem DiGeorge critical region 8 Protein (DGCR8), zu precursor-microRNAs (pre-miR) prozessiert. Pre-miRs sind 70-100 Basenpaare (bp) lang und besitzen eine charakteristische Haarnadelstruktur (*engl.* hairpin structure). Diese hairpin pre-miRNAs werden durch Exportin 5 ins Zytoplasma transportiert. Die doppelstrangspezifische Ribonuklease Dicer synthetisiert schließlich die reife, 19-23 nt lange, einzelsträngige miRNA in Form eines Sense:Anti-Sense-miRNA:miRNA* Duplex-Paars [75].

Reife miRNAs werden nach Bindung des Argonaute 2 Proteins in den miRNA-induced silencing complex (miRISC) aufgenommen [74,76]. Dieser bindet schließlich die Ziel-mRNA, durch partielle Komplementarität von ca. 2-8 Basen zwischen der reifen miRNA sowie ihrer Ziel-mRNA. Die instabile miRNA* wird degradiert.

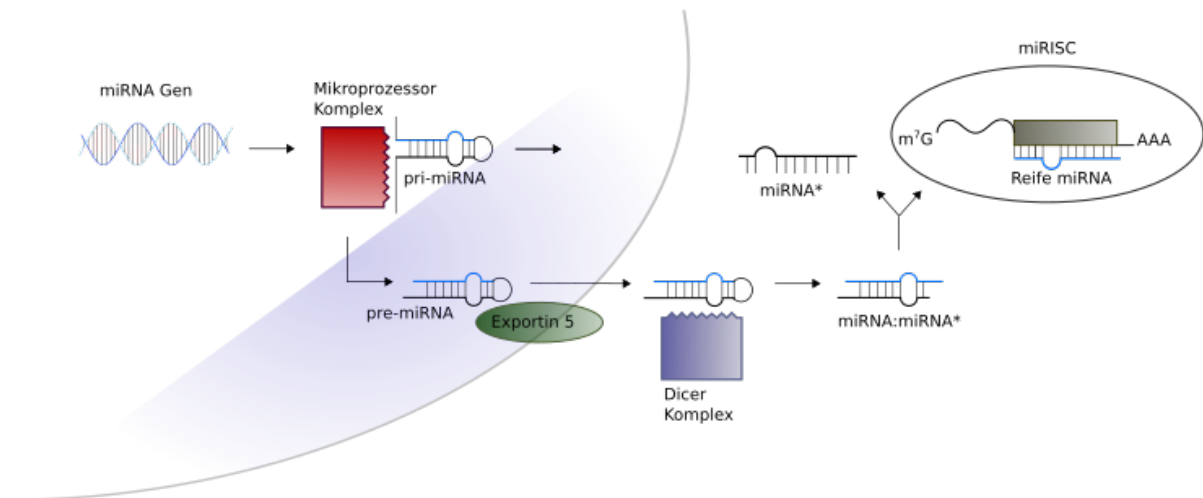


Abbildung 1: Schematische Darstellung der miRNA Biogenese

Transkription der pri-miRNA im Zellkern und anschließende Prozessierung durch den Mikroprozessorkomplex, bestehend aus Drosha und DGCR8. Exportin-5 gekoppelter Transport der pre-miRNA in das Zytoplasma und durch den Dicer Komplex vermittelte enzymatische Umwandlung dieser in ein miRNA:miRNA* Duplexpaar. Schließlich wird die reife miRNA in den miRISC aufgenommen.

Genexpressionsanalysen konnten zeigen, dass sich die miRNA Expression in malignen Hirntumoren vom Normalhirngewebe unterscheidet und dass das miRNA Expressionsprofil mit der Malignität der Tumoren korreliert [77]. Mittlerweile werden miRNA Expressionsprofile als gewebespezifische Biomarker und zur Klassifizierung von verschiedenen Tumoren genutzt [78,79]. Dies beruht darauf, dass Veränderungen im miRNA Expressionsprofil relevante funktionelle Veränderungen der Zellen zur Folge haben. Die Veränderungen im Transkriptom können dabei sowohl onkogen, als auch tumorsupprimierend wirken [80]. Dies ist insbesondere im Hinblick auf inflammatorische Signalwege von Relevanz [81,82]. Im humanen Immunsystem konnten sogenannte Immuno-miRs identifiziert werden, die sowohl die angeborene, als auch die adaptive Immunantwort in Immunzellen regulieren. Das eine miR alleine die Expression einer Vielzahl von Genen innerhalb funktionell verwandter Signalwege beeinflussen kann, bedingt eine massive Regulation der inflammatorischen Genexpression durch Immuno-miRs [83,84]. In Tumorzellen ist die Funktion der Immuno-miRs noch weitestgehend ungeklärt. Da die Inflammation aber ein Schlüsselmediator der Tumorigenität ist, könnten Immuno-miRs als antiinflammatorische Tumorsuppressoren diesen wesentlichen Pathomechanismus abschwächen.

1.3.1 Immuno-miR-93

Eine der im GBM potenziell relevanten Immuno-miRs ist die hsa-microRNA-93-5p (miR-93). Sie gehört zum miR-106b~25 cluster, welches durch das Gen minichromosome maintenance complex component 7 (MCM7) auf Chromosom 7q22 kotranskribiert wird [85]. Abweichende Expression des miR-106b~25 clusters und MCM7 wurde in verschiedenen malignen Entitäten beschrieben [85-91]. Die MiR-93 besitzt in zahlreichen Zelltypen antiinflammatorische Eigenschaften. Beispielsweise reprimiert sie in Leiomyomzellen die Expression von IL-8 [85]. In Lipopolysaccharid (LPS) -stimulierten Makrophagen ist die Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinase 4 (IRAK4) als direktes miR-93 Target beschrieben [87]. IRAK4 fungiert unter anderem als Aktivator des inflammatorischen NF- κ B Signalwegs [92]. In Endometriosezellen konnte eine direkte miR-93 Regulation der Matrix Metalloproteinase-3 (MMP-3) und des VEGF gezeigt werden, was die Migration und Invasion von endometrialen Stroma Zellen inhibierte [89]. Weiterhin konnte in pluripotenten Stammzellen eine direkte Interaktion der miR-93 mit dem 3'UTR des Transforming Growth Factor Beta Receptor II (TGFB2) nachgewiesen werden [90,91]. Der Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) Signalweg trägt zur Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) bei und induziert die Angiogenese, beides maßgebliche Induktoren der Tumormetastasierung [93,94].

Zusammenfassend korreliert die Expression der Immuno-miR-93 in verschiedenen Zellentitäten mit einem antiinflammatorischen Zellphänotyp. Die Zusammenhänge im GBM sind bislang noch nicht untersucht.

2 Fragestellung

Die komplexe inflammatorische Mikroumgebung des GBMs fördert die Migration, Angiogenese und Invasivität des Tumors und festigt dadurch seinen aggressiven Phänotyp. Immuno-miRs regulieren in verschiedenen Zellentitäten die inflammatorische Genexpression. Sie könnten als antiinflammatorische Tumorsuppressoren die Entzündungsreaktion als einen zentralen tumorinduzierenden Pathomechanismus antagonisieren.

In der vorliegenden Dissertation wird die Rolle der miR-93 auf tumorogene Eigenschaften von GBM Zellen untersucht. Konkret werden folgende Fragen untersucht:

Welchen Einfluss hat die inflammatorische Mikroumgebung im GBM auf das Genexpressionsprofil der Tumorzellen?

Welchen Effekt hat die miR-93 auf die Expression inflammatorischer Gene in GBM Zellen?

Welche direkten miR-93 Zielgene können im GBM experimentell validiert werden?

Welchen funktionellen Einfluss hat die miR-93 im GBM?

3 Material

3.1 Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid/Bis Solution (30%)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose Serva Tablets 0,5g/tablet	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Anti-mouse Immunglobulin (Ig)-G, Horseradish Peroxidase (HRP)-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
autoMACS® Rinsing Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
β-Actin (8H10D10) Mouse mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
β-Actin (13E5) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Cy3 dye-labeled Pre-miR™ Negative Control (NC)	Life Technologies, Darmstadt
CutSmart® Buffer	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (w: 1g/L Glucose; w/o: L-Glutamin)	Lonza, Verviers, Belgien
DMEM-Medium (w: 4.5g/L Glucose, Natriumpyruvat, 3.7g/L NaHCO ₃ ; w/o: L- Glutamin)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Dimethyloxalylglycine (DMOG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO) cell culture grade	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DNA Ladder 100bp	Promega GmbH, Mannheim
DNA Ladder 1kb	Thermo Scientific, Schwerte
Deoxynucleoside Triphosphate Set (dNTPs)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28	Life Technologies, Darmstadt
Ethanol for molecular biology	Merck KgaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
FastStart Essential DNA Probes Master	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom AG, Berlin

Geltrex Basement Membrane Matrix	Thermo Fisher, Martinsried
Glycin	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Hanksche Lösung ohne Phenolrot (<i>engl. Hank's balanced salt solution, HBSS</i>)	Apotheke Klinikum der Universität München
Hautdesinfiziens Cutasept F	Bode Chemie GmbH, Hamburg
Hefeextrakt Servabacteria pulverförmig	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
HEPES Buffer Solution	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Histopaque 1077	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hsa-miR-93 Anti-miR miRNA Inhibitor	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Human IL-1 β , premium grade	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Lamin A (H-102): sc-20680	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA
L-Glutamin 200mM	Biochrom AG, Berlin
Low Serum Growth Supplement (LSGS)	Thermo Fisher, Martinsried
MACS BSA Stock Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS Neuro Brew-21 w/o Vitamin A	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS Neuro Medium	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magermilchpulver	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Medium 200PRF	Thermo Fisher, Martinsried
Medizinisches Kohlendioxid LAPAROX ®	Linde AG, Pullach
MEM <i>Non-essential amino acids</i> (NEAA) (100x)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Nonfat dry milk Blotting-Grade Blocker	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
NotI-HF®	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
Oligo- Desoxythymidine Primer (Oligo-(dT))	Qiagen GmbH, Hilden
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Schwerte
Penicillin-Streptomycin (10,000U/ml)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin-Glutamine (100x)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
peqGREEN DNA- und RNA-Farbstoff	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Apotheke Klinikum der Universität München
Pmel	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pre-miR-miRNA Precursor hsa-miR-93-5p	Life Technologies GmbH, Darmstadt

Pre-miR-miRNA Precursor Negative Control #1	Life Technologies GmbH, Darmstadt
psiCHECK tm -2 Vektor	Promega GmbH, Mannheim
Purified Mouse Anti-Human HIF-1 α Clone 54/HIF-1 α (RUO)	BD Biosciences, Heidelberg
QuikChange [®] XL10-Gold Ultracompetent Cells	Stratagene, Inc., La Jolla, USA
Random Hexamers	Qiagen GmbH, Hilden
RNaseOUT tm Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Small interfering RNA (siRNA) ON-TARGETplus Non-targeting Pool Negative Control (siNC)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
SMARTpool: ON-TARGETplus Human HIF1A siRNA (siHIF-1 α)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
SMARTpool: ON-TARGETplus Human MAP3K2 siRNA (siMap3K2)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Sodium Pyruvate (100mM)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Stickstoff 5.0	Linde AG, Pullach
Strata Clone [™] Solo Pack [®] Competent Cells	Stratagene, Inc., La Jolla, USA
T4 DNA Ligase	Promega GmbH, Mannheim
T4 DNA Ligase Puffer	Promega GmbH, Mannheim
Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer (5x)	5Prime, Neobits, Inc., Santa Clara, USA
Temed	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
TRIS	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
TRIS-HCl	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Trypsin/ Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Solution	Biochrom AG, Berlin
Trypton	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tween 20	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
XhoI	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
Zellyse Puffer (10x)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

Tabelle 1: Reagenzien

3.2 Kits und Assays

Bezeichnung	Hersteller
Brain Tumor Dissociation Kit (P)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Dual-Glo Luciferase Assay System	Promega GmbH, Mannheim
20x LumiGLO Reagent and 20x Peroxide	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
LEGEND MAX™ Human CXCL5 <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) Kit with Pre-coated Plates	BioLegend, San Diego, USA
LEGEND MAX™ Human IL-8 ELISA Kit with Pre-coated Plates	BioLegend, San Diego, USA
LEGEND MAX™ Human IL-6 ELISA Kit with Pre-coated Plates	BioLegend, San Diego, USA
mirVana™ miRNA Isolation Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Neon Transfection System 10µl Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Neon Transfection System 100µl Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Nuclear Extract Kit	Actif Motif, La Hulpe, Belgien
Pan T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Pierce bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Schwerte
PeqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
ProcartaPlex Mix&Match Human Kit	Thermo Fisher, Martinsried
Pure Yield Plasmid Midiprep System	Promega GmbH, Mannheim
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
RNAqueous Total RNA-Isolation Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
StrataClone Ultra Blunt <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) Cloning Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
SuperScript III Reverse Transcriptase Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
TaqMan® MicroRNA Assay, Assay Name: U47, hsa-miR-93-5p	Life Technologies GmbH, Darmstadt
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Turbo DNA-Free Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega GmbH, Mannheim
---------------------------------------	------------------------

Tabelle 2: Kits und Assays

3.3 Medien und Puffer

Bezeichnung	Zusammenstellung
Blockpuffer	5 % Magermilch in TBS-T
Complete Lysis Buffer	5 µl 10mM Dithiothreitol (DTT), 44.5 µl Lysis Buffer AM1, 0.5 µl Protease Inhibitor Cocktail
6x SDS-Ladepuffer	375 mM Tris-HCl pH 6.8, 6% SDS, 48% glycerol, 9% 2-Mercaptoethanol, 0.03% Bromphenol Blau
LB-Agar	10 g Trypton, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 15 g Agar in 1Liter ddH ₂ O gelöst und autoklaviert
LB-Medium	10 g Trypton, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt in 1Liter ddH ₂ O gelöst und autoklaviert
Medium für <i>Human Embryonic Kidney</i> Zellen (HEK-293)	DMEM-Medium (w: 1g/L Glucose; w/o: L-Glutamin), 10% FCS (hitzeinaktiviert), 1% L-Glutamin (200mM), 1% Penicillin-Streptomycin, 1% MEM-NEAA
Medium für <i>Human umbilical vein endothelial cells</i> (HUVEC)	500 ml Medium 200PRF; 10 ml Low Serum Growth Supplement (LSGS)
Medium für Primärzellen aus Glioblastom Biopsaten	10ml MACS Neuro Brew-21 w/o Vit. A zu 500ml MACS Neuro Medium, zusätzlich supplementieren von 10% FCS (hitzeinaktiviert), 2% Penicillin-Streptomycin und 2% Glutamin
Medium für T98G	DMEM-Medium (w: 4.5g/L Glucose, Sodium Pyruvate, 3.7g/L NaHCO ₃ ; w/o: L-Glutamin), 10% FCS (hitzeinaktiviert), 1% L-Glutamin (200mM), 1% Penicillin-Streptomycin
Medium für U87-MG	DMEM-Medium (w: 1g/L Glucose; w/o: L-Glutamin), 10% FCS (hitzeinaktiviert), 2% L-Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine, 1% MEM-NEAA, 1% Sodium Pyruvate

PBS	pH 7.4, Na ⁺ 171 mmol/l, K ⁺ 1,7 mmol/l, 100ml
PBS/Phosphatase Inhibitors	0.4ml 10x PBS, 3.4 ml zweifach deionisiertes Wasser (ddH ₂ O), 0.2 ml Phosphatase Inhibitors
Puffer A	1425ml autoMacs Rinsing Solution, 75ml MACS BSA Stock Solution
Sammelgelpuffer	1 M Tris pH 6.8 in ddH ₂ O
SDS Laufpuffer (10x)	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1% SDS in ddH ₂ O
Stripping Puffer	15 g Glycin 1 g SDS 10 ml Tween 20 in 1Liter ddH ₂ O gelöst pH 2,2
TBS-T	TBS mit 0,1% Tween-20
Transferpuffer (10x)	250 mM Tris 1,92 M Glycin in ddH ₂ O
Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8,8 in ddH ₂ O
Trenngel (14%)	3.5 ml Trenngelpuffer, 140 µl SDS (10%), 6.53 ml Acrylamid / Bisacrylamid (30%), 70 µl APS (40%), 5.8 µl Temed, 3.75 ml ddH ₂ O
Sammelgel (6%)	500 µl Sammelgelpuffer, 40 µl SDS (10%), 800 µl Acrylamid / Bisacrylamid (30%), 20 µl APS (40%), 4 µl Temed, 2.6 ml ddH ₂ O
Waschpuffer / Inkubationspuffer	1 % Magermilch in TBS-T

Tabelle 3: Medien und Puffer

3.4 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Cell Culture Plate, 12 well	Greiner Bio-One, Frickhausen
Cell Culture Flask 25cm ² , 75cm ² , 175cm ²	Greiner Bio-One, Frickhausen
CryoTube™ Vials	Thermo Scientific, Schwerte
Culture-Inserts 2 Well	Ibidi, Martinsried
Delta Disposable Cell Spreader steril	Heathrow Scientific LLC, Vernon Hills, USA
Dualfilter 20µl PCR clean/Steril tips	Eppendorf, Hamburg
Extra Thick blot paper, Filter paper	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Falcon 50ml	Greiner Bio-One, Frickhausen
Immobilon Transfermembran	Merck KGaA, Darmstadt
Impfschlinge 1 µl weiß	Sarstedt, Nümbrecht

Laborglasflaschen 200, 1000 ml	DURAN Group GmbH, Wertheim
Light Cycler 480 multiwell Plate 96, white	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Lightcycler 480 Sealing Foil	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
96-Well Magnetplatte affymetrix eBioscience	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
MACS Cell Separation Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS SmartStrainers (100, 70, 40 µm)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Messzylinder 250:5.0 ml, 500:10 ml	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
Mini-Protean 3 System Glass Plates	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Multifly Set	Sarstedt, Nümbrecht
Multiply Pro Gefäß 0,2ml, PP	Sarstedt, Nümbrecht
µ slide Angiogenesis	ibidi, Martinsried
Organ Tissue Culture Dish 60x55mm	Becton Dickinson, Heidelberg
Parafilm	Bemis, Oshkosh, USA
Pasteurpipette aus Glas 150mm	A.Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg
Petrischale 92x16mm mit Nocken	Sarstedt, Nümbrecht
Pipette (0,5-10µl, 5-20µl, 10-100µl, 50-200µl, 100-1000µl, 500-2500µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitze autoklaviert (0,1-10µl, 5-20µl, 2-200µl, 500-2500µl)	Eppendorf, Hamburg
Reagiergefäß 1,5ml Micro Tube	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 2,0ml Safe seal	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß 1,6 ml steril	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäß 1,6 ml blau	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäß 1,6 ml autoklaviert	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Röntgenfilm	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, B
Safe Lock Tube 0,5 ml (PCR-clean)	Eppendorf, Hamburg
Safe Lock Tube 0,5 ml (Biopur,steril)	Eppendorf, Hamburg
S-Monovette 7.5 ml LH	Sarstedt, Nümbrecht
Safequard 10µl Microread tips	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Safe seal tips professional 200µl, 1000µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Serologische Stripette 10, 25, 50ml	Costar, Amsterdam Niederlande

Serologische Stripette 5ml	Sarstedt, Nümbrecht
TC-Flasche T75,Cell+	Sarstedt, Nümbrecht
Tube, 13 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Kryotube	Thermo Fisher, Martinsried
Zellzählcup Vi Cell	Beckman Coulter, Krefeld

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

3.5 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
AGFA Curix 60	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
ARPEGE 140	Air Liquide Medical GmbH, Düsseldorf
Attune® Acoustic Focusing Cytometer	Life Technologies, Darmstadt
Brutschrank APT.line™ BD (E2)	Binder GmbH, Tuttlingen
Brutschrank Function Line	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Bühler Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Capnomac Ultima	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
E-BOX VX2 Geldokumentationssystem	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Feinwaage MP 300	Chyo Balance Corp., Kyoto, J
FilterMax F3 MultiMode Microplate Reader	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Hand Held Magnetic Plate Washer	Thermo Fisher, Martinsried
Hera Safe Sterilbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Light Cyclers 480	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Luminex 200	Luminex Corporation, Texas, USA
Mastercycler Gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Milli-Q Advantage A10 Water System	Merck KGaA, Darmstadt
Mikroskop Modell IB	Optech Inc., Vaughan, CAN
Mini-Protean System Casting Stand	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Modular Incubator Chamber	Billups-Rothenberg Inc., Del Mar, USA
NanoDrop NC-2000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Neon Transfection System	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Olympus IX50 inverses Phasenkontrastmikroskop	OLYMPUS EUROPA SE & CO. KG, Hamburg

Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Promega Vac-Man Laboratory Vacuum Manifold	Promega GmbH, Mannheim
Quadro MACS Multistand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Standard Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen
Sub-Cell GT Elektrophorese System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
SONOPULS 2070	Bandelin electronic GmbH und Co. KG, Berlin
Ultrazentrifuge TGA 50	Kontron AG, Zürich, Schweiz
Thermoshaker für Mikrotiterplatten	neoLab, Heidelberg
Thermostat 5320	Eppendorf AG, Hamburg
Tischautoklav Systec DE-45	Systec GmbH, Wettenberg
Ultrazentrifuge TGA-50	Hemotec, Gellerkirchen, Schweiz
Vakuum-Pumpe	ILMVAC GmbH, Ilmenau
vapo.protect	Eppendorf AG, Hamburg
Vi-Cell XR Cell Viability Analyzer	Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA
Wasserbad SWB 25	Haake Technik GmbH, Vreden
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau

Tabelle 5: Geräte

3.6 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von Metabion, Martinsried synthetisiert. Die Universal ProbeLibrary (UPL) Sonden und Single Assays wurden von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim erhalten.

Primer	Sequenz	UPL-Sonde
qPCR		
COX2 Forward	5' gcttatgctgaagccctatga 3'	#2
COX2 Reverse	5' tccaactctgcagacatttcc 3'	#2
CXCL5 Forward	5' ccttttctaaagaaagtcatccaga 3'	#48
CXCL5 Reverse	5' tgggttcagagacctccaga 3'	#48
G-CSF Forward	5' gtgctgctcggacactctct 3'	#20

G-CSF Reverse	5' cgctatggagttggctcaag 3'	#20
HIF-1 α Forward	5' aacctgatgctttaactttgctg 3'	#28
HIF-1 α Reverse	5' tggcatcagtttctgtgctg 3'	#28
IL-1 β Forward	5' gaggcacaaggcacaacag 3'	#41
IL-1 β Reverse	5' ccatggctgcttcagacac 3'	#41
IL-6 Forward	5' gatgagtacaaaagtctgatcca 3'	#40
IL-6 Reverse	5' ctgcagccactggttctgt 3'	#40
IL-8 Forward	Single assay (Assay Id:103136)	
IL-8 Reverse	Single assay (Assay Id:103136)	
LIF Forward	5' tgccaatgccctccttattc 3'	#26
LIF Reverse	5' gtccaggtgttggggaac 3'	#26
MAP3K2 Forward	5' ggctgaggaagttgtccatc 3'	#58
MAP3K2 Reverse	5' agctctgaccctaggcatt 3'	#58
SDHA Forward	5' gaggcagggtttaatacagca 3'	#132
SDHA Reverse	5' ccagttgtcctcctcatgt 3'	#132
TBP Forward	5' gaggcagggtttaatacagca 3'	#87
TBP Reverse	5' atagggattccgggagtcac 3'	#87
Klonierung		
COX2 Forward	5' ctcgaggccagagagaaatgagtttgacg 3'	
COX2 Reverse	5' gcggccgcagcttggtacttcattaacctca 3'	
CXCL5 Forward	5' gtttaactggcaattgactatagtgtagc 3'	
CXCL5 Reverse	5' gcggccgcaagctctctgtgtccccta 3'	
G-CSF Forward	5' ctcgagcctggtgcctcccactcg 3'	
G-CSF Reverse	5' gcggccgccttcagccacctcccag 3'	
HIF-1 α Forward	5' ctcgagtggatcacagacagctcattt 3'	
HIF-1 α Reverse	5' gcggccgccaaccacaaagagcaaaagg 3'	
IL-6 Forward	5' ctcgaggctgcaggacatgacaactc 3'	
IL-6 Reverse	5' gcggccgctggtggcagtgacaagaaac 3'	
LIF Forward	5' ctcgagggtcgatctgagagaatgg 3'	
LIF Reverse	5' gcggccgcacctggacaagggtgagtg 3'	
MAP3K2 Forward	5' ctcgaggctgatgaactctaaggcaca 3'	
MAP3K2 Reverse	5' gcggccgcggtgtagacagaggtagga 3'	
Mutagenese Mutierte Basen sind fett markiert		
HIF-1 α mut. BS1 Forward	5' caatgtttgattttatgc gt ttttgctctattaacatcc 3'	
HIF-1 α mut. BS 1 Reverse	5' ggatgttaatagcgacaaaa ac gcataaaatcaaacattg 3'	
MAP3K2 mut. BS 1 Forward	5' ccttctctgactgc gt ttttctttttataaaaaaaga 3'	

MAP3K2 mut. BS 1 Reverse	5' tcttttttataaaaaagaaaa acgcagtcagagagaagg 3'	
MAP3K2 mut. BS 2 Forward	5' ttcagagagataaaagcgttttagtacatagtcactctttt 3'	
MAP3K2 mut. BS 2 Reverse	5' Aaaagagtgactatgtactaaaacgctttatctctgaa 3'	

Tabelle 6: Oligonukleotide

Restriktionsenzym	Sequenz
NotI-HF (20 U/μl)	5' gcggccgc 3'
PmeI (20 U/μl)	5' gtttaaac 3'
XhoI (20 U/μl)	5' ctcgag 3'

Tabelle 7: Restriktionsendonukleasen

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Die Arbeit mit den verschiedenen Zelllinien erfolgte unter der Sicherheitswerkbank (Heraeus). Die Zellen wurden in zellspezifischem Medium und in wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

Zellen	Beschreibung	Eigenschaften	Kulturmedium
U-87 MG (ATCC® HTB-14™)	Homo sapiens, Hirngewebe, Glioblastom; Astrozytom Grad IV	Adhärente Zellen	U-87 MG Medium
T98-G (ATCC® CRL-1690™)	Homo sapiens, Hirngewebe, Glioblastoma Multiforme	Adhärente Zellen	T98G Medium
HEK-293 (ATCC® CRL-1573™)	Homo sapiens, embryonales Nierengewebe	Adhärente Zellen	HEK-293 Medium
HUVEC (Thermo Fisher, Martinsried)	Homo Sapiens, Neugeborenes (<14 Tage), Umbilikalvene	Adhärente Zellen	HUVEC-Medium

Tabelle 8: Zelllinien

4.1.1 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden bei Erreichen von etwa 60-70%-iger Konfluenz subkultiviert. Dazu wurde das verbrauchte Zellmedium mit der Vakuumpumpe (ILMVAC GmbH) abgesaugt. Anschließend wurden die Zellkulturschalen (25-175 cm²) mit PBS (Apotheke Klinikum der Universität München) gespült. Durch die Zugabe von Trypsin/EDTA (Biochrom AG, Berlin) wurden die adhärennten Zellen von der Oberfläche gelöst. Der Ablösungsprozess wurde lichtmikroskopisch beobachtet und durch die Zugabe von PBS neutralisiert. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon überführt und anschließend für 3 Min. bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Die Zellzahl und Viabilität wurden anschließend durch den Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer

(Beckman Coulter) ermittelt. Abhängig von der Menge der zu rekultivierenden Zellen, wurde das entsprechende Zellsuspensionsvolumen in neue Zellkulturgefäße verteilt und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

4.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen wie oben genannt von der Zellkulturschale gelöst. Anschließend wurden 2×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryotube überführt. Das zellspezifische Medium wurde dazu zusätzlich mit 10% DMSO (Sigma-Aldrich) und 10% FCS (Biochrom AG) versetzt, um die während des Einfrierprozesses für die Zellen schädliche Eiskristallbildung zu verhindern und den Nährstoffgehalt des Mediums zu erhöhen. Das Kryotube wurde über Nacht bei -80 °C schockgefroren und danach in der Flüssigstickstoff Kryotonne ARPEGE 140 (Air Liquide Medical GmbH) bei -178°C gelagert.

Um kryokonservierte Zellen wieder aufzutauen wurde das Kryotube im 37°C Wasserbad geschwenkt. Die Zellsuspension wurde unter der Sterilbank in ein 50 ml Falcon übertragen und mit 15 ml zellspezifischem Medium (37°C, 20% FCS) aufgefüllt. Anschließend wurde das Falcon 5 Min. bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturschale mit 20% FCS-haltigem, zellspezifischem Medium transferiert. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium entsprechend der Morphologie der Zellen mit 10% FCS-haltigem, bzw. 20% FCS-haltigem Medium ersetzt.

4.1.3 Gewinnung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*engl. peripheral blood mononuclear cells, PBMCs*) wurden aus heparinisiertem, venösem Vollblut von freiwilligen gesunden Probanden isoliert. Das Blut wurde einem nüchternen Probanden in Lithium-Heparin Röhren (Sarstedt) entnommen. 3 ml Ficoll-Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich) wurden mit 3 ml Blut in einem 13 ml Röhren überschichtet. Nach Zentrifugation für 15 Min. bei 3000 rpm sammelten sich die Lymphozyten und Monozyten, ihrer jeweiligen Dichte entsprechend, in der Interphase zwischen Überstand (Plasma/ Thrombozyten) und Histopaque an. Der höchsten Dichte entsprechend bilden die Erythrozyten und Granulozyten die unterste Schicht. Die PBMCs in der Schicht unterhalb des Plasmas wurden inklusive des Ficolls abpipettiert und in 13 ml Röhren zusammengeführt.

Es folgten 3 Waschschrte bei denen die Röhren jeweils mit HBSS aufgefüllt und für 5 Min. bei 2000 rpm zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde bis auf 1 ml abgesaugt, das Pellet in

diesem resuspendiert und die Zellsuspension in ein 13 ml Röhrchen überführt. Dieses wurde erneut zentrifugiert und das Pellet in 1 ml HBSS resuspendiert.

Die Zellzahl und Viabilität wurden anschließend durch den Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter) ermittelt.

4.1.4 Humane Glioblastom Gewebeproben

GBM-Gewebeproben wurden mittels stereotaktischer Biopsie durch die Kollegen der Neurochirurgie entnommen und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Für das Studienprotokoll lag von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München (Projekt- Nr. 325-11; 216/14) eine Genehmigung vor. Alle Patienten gaben vor der Biopsat-Gewinnung eine schriftliche Einverständniserklärung ab.

4.1.5 Isolation von Primärzellkulturen aus Gewebepreparaten

Primärzellen wurden mit dem Brain Tumor Dissociation Kit (P) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) isoliert. Die Menge der zu nutzenden Pufferlösungen waren 50 µl Enzym N, 3890 µl Puffer X, 40 µl Puffer Y und 20 µl Enzym A. Das Hirntumorgewebe wurde bis zur Verarbeitung in PBS und auf Eis gelagert. Der Puffer X wurde für 10-15 Min. bei 37 °C im Wasserbad gewärmt. Alle folgenden Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt:

Das Tumorgewebe wurde in einer Petrischale manuell zerkleinert. Die zerkleinerten Tumorteile wurden in 10 ml HBSS aufgenommen und in ein 15 ml Röhrchen transferiert. Es folgte die Zentrifugation der Proben für 5 Min. bei 300xg. Der Überstand wurde verworfen und die oben genannten Volumina der Puffer X, Y, Enzym N und A hinzugegeben. Der Inhalt des Röhrchens wurde mithilfe einer Stripette auf einer 12-Well Platte aufgeteilt und für 15 Minuten bei 37° und 250 rpm im Schüttler inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit Stripetten in absteigendem Volumen (bis 1000µl) weiter mechanisch dissoziiert. Nun wurde die Suspension über MACS SmartStrainers (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) in absteigender Netzdicke (100µm, 70µm, 40µm) in 50 ml Röhrchen überführt und 10 ml HBSS über die jeweiligen Filter gegeben. Es folgte die Zentrifugation über 5 Min. bei 300xg. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml MACS Neuro Medium (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) aufgenommen. Nach Zellzählung wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche – TC-Flasche T75,Cell+ (Sarstaedt, Nümbrecht) für sensitive adhärenente Zellen – übergeben.

4.1.6 Stimulation von Zellen mit IL-1 β und mit Überstand stimulierter PBMCs

GBM-Zellen wurden für 24 Stunden mit 10 ng/ml IL-1 β (Miltenyi Biotec) oder dem Überstand stimulierter PBMCs stimuliert.

2.5x10⁶ PBMCs wurden in die Wells einer 12-Well Zellkulturschale gegeben und mit 25 μ l/Well Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Life Technologies) stimuliert. Nach 24-stündiger Inkubation wurde das Medium abgenommen, für 3 Min. bei 2800 rpm zentrifugiert, die mit den Beads markierten Zellen somit von dem Medium getrennt und 900 μ l des Überstandes mit GBM-Zellen inkubiert.

4.1.7 Inkubation in Hypoxie

Für Experimente unter hypoxischen Bedingungen wurden die Zellen in einer Hypoxie-Kammer bei 5% O₂ und 40 mmhg CO₂ (LAPAROX ®, Linde AG) inkubiert. Dazu wurde unter Verwendung eines Schlauchsystems 99.99 %-iger Stickstoff (N₂ Stickstoff 5.0, Linde AG) in eine geschlossene Hypoxiekammer (Billups-Rothenberg Inc.) geleitet, in der die entsprechenden Zellkulturschalen bei 37°C im Brutschrank inkubiert wurden.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Transiente Transfektion mittels Elektroporation

Sämtliche im Laufe der Arbeit durchgeführten Transfektionen wurden mit dem NeonTM Transfection System (Invitrogen) durchgeführt. Dabei führten Spannungspulse nach dem Prinzip der Elektroporation zur vorübergehenden Permeabilisierung der Zellmembran. Dies erlaubte eine zeitlich limitierte Aufnahme von Nukleinsäuren. Folgende Elektroporationsparameter wurden entsprechend der zu transfizierenden Zelllinie eingesetzt:

Zellen	Volt [V]	Zeit [ms]	Pulse	Transfektionsspitze [μ l]
U-87 MG	1300	30	1	10; 100
Primärzellen	1300	30	1	100
T98G	1200	30	1	100
HEK-293	1150	20	2	10

Tabelle 9: Elektroporationsparameter

Analyse der:	Zellzahl	miR, antimiR und siRNA	Reporter-Vektor	Zellkultur Schale	Medium (HEK ohne Antibiose)
mRNA Expression	2.5×10^5	50 nM (miR) 50 nM (antimiR) 100 nM (siRNA)		12-Well	900 μ l
Protein Expression	$1-1.5 \times 10^6$	50 nM miR		6-Well	1900 μ l
Luciferase Aktivität	1×10^5	50 nM miR	1 μ g	24-Well	490 μ l

Tabelle 10: Übersicht verschiedener Transfektionsmethoden

Die Transfektionen wurden nach dem folgenden beispielhaften Prinzip (miR-93/NC Transfektion in U87 Zellen, Neon Transfection System 100 μ l Kit (Life Technologies)) durchgeführt. Unterschiede können aus Tabelle 9 und 10 entnommen werden:

2.5×10^5 U87 Zellen wurden in 99 μ l Puffer R resuspendiert. Die miR-93/ NC (Pre-miR miRNA Precursor hsa-miR-93-5p, Pre-miR-miRNA Precursor Negative Control #1; Life Technologies Gmb) wurde in einer Endkonzentration von 50 nM beigefügt. Das Transfektionsvolumen wurde luftblasenfrei in einer 100 μ l Transfektionsspitze aufgenommen und in das Transfektionstube gesteckt. Das Transfektionsprogramm zur Elektroporation der Zellen wurde wie in Tabelle 9 beschrieben eingestellt. Nach abgeschlossener Transfektion wurde das Transfektionsvolumen in 900 μ l antibiotikafreiem HEK Medium in einer 12-Well Zellkulturschale für 48 Stunden inkubiert.

Mastermix:	
Zellen	2.5×10^5
miR-NC/93 (50 nM) [μ l]	1
Puffer R [μ l]	99
Gesamtvolumen [μ l]	100

Tabelle 11: Mastermix Transfektion

4.2.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Die Transfektionseffizienz wurde am Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Life Technologies) durchflusszytometrisch quantifiziert. Dazu wurden 2.5×10^5 U87 Zellen wurden

mit 50 nM fluoreszenzmarkierter pre-miR (Cy3 dye-labeled Pre-miRTM Negative Control, Life Technologies) transfiziert. Nach Inkubation für 24 und 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, zweimal in HBSS-Puffer gewaschen, bei 1600 rpm für 3 Min. zentrifugiert und letztlich in 1 ml PBS resuspendiert. Die Fluoreszenz wurde im Attune Acoustic Focusing Cytometer detektiert und mithilfe der Attune Cytometric Software Version 1.2 (Life Technologies) ausgewertet: Cy3 dye-labeled Pre-miRTM Negative Control; Absorptionsmaximum bei 550 nm und Emissionsmaximum bei 570 nm. Blauer Laser 488 nm, BL-2 Filter: 574/24 nm. Als Vergleich dienten U87 Zellen, die mit Pre-miR-miRNA Precursor Negative Control #1 transfiziert wurden.

4.2.3 DNA Extraktion

Genomische DNA (gDNA) wurde mithilfe des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen) aus 200 µl heparinisiertem Vollblut gesunder, freiwilliger Probanden extrahiert. Die Zellen wurden zunächst durch 20 µl QIAGEN Protease und 200 µl Puffer AL lysiert und 15 Sek. gevortext. Nach Inkubation des Ansatzes für 10 Min. bei 56°C wurden 200 µl Ethanol hinzugefügt. Nach 15-sekündigem Vortexen wurde die Suspension auf die Membran einer QIAamp Mini Spin Säule gebunden und für 1 Min. bei 8000 rpm zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit den im Kit zur Verfügung gestellten Waschpuffern und eine anschließende Leerzentrifugation des Filters für 1 Min. bei 13200 rpm. Die im Filter gebundene DNA wurde in 40 µl zweifach deionisiertem Wasser (ddH₂O) eluiert. Der Ansatz wurde 1 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und folgend für 1 Min. bei 8000 rpm zentrifugiert. Der DNA-Überstand wurde abgenommen, die Konzentration spektralphotometrisch am NanoDrop 2000 (Peqlab Biotechnologie GmbH) bei 260 nm und 280 nm bestimmt und der Reinheitsgrad der DNA mithilfe des OD260/OD280-Quotienten – bei 1.8 für von Alkohol oder Proteinresten freie DNA – überprüft.

4.2.4 RNA-Extraktion und DNase-Verdau

Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem RNAqueous Total RNA-Isolation Kit für mRNA-Expressionsanalysen bzw. dem *mirVana*TM miRNA Isolation Kit (beide Life Technologies) zur Quantifizierung von miRNAs und zur RNA Extraktion aus Normalhirngewebe und GBM Biopsaten.

4.2.4.1 RNA-Extraktion mittels RNAqueous Kit

Die Zellen wurden gemäß Herstellerangaben in RNAqueous Lysis/Binding Solution denaturiert. Das gleiche Volumen von 64%-igem Ethanol wurde hinzu pipettiert. Nach sanftem Vortexen wurde das Zellvolumen auf einem RNAqueous-Filter gebunden. Durch Zentrifugation

für 20 Sek. bei 13200 rpm wurde die Suspension durch den Filter getrieben. Es folgten drei Waschschrte mit den zwei im Kit zur Verfügung gestellten RNAqueous-Waschpuffern und eine anschließende Leerzentrifugation des Filters für 1 Min. bei 13200 rpm. Nach Transfer des Filters und der an ihm gebundenen RNA in ein neues steriles Reagiergefäß, wurde die RNA in 30µl ddH₂O (75 °C) eluiert. Der Ansatz wurde 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und folgend für 30 Sek. bei 13200 rpm zentrifugiert.

4.2.4.2 RNA-Extraktion mittels mirVana miRNA Isolations Kit

Das mirVana™ miRNA Isolation Kit (Life Technologies) eignet sich besonders zur Extraktion kleiner RNAs und somit zur Quantifizierung von miRNAs. Außerdem wurde das Kit zur Isolation von RNA aus Normalhirngewebe und Glioblastompräparaten verwendet.

Die Zellen wurden gemäß Herstellerangaben in 300 µl mirVana™-Lysepuffer aufgenommen. 300 µl miRNA Homogenate Additive wurden hinzugefügt und der Ansatz für 15 Sek. gevortext. Nach 10-minütiger Lagerung der Proben auf Eis wurden 300 µl Acid-Phenol:Chloroform hinzugegeben. Der Ansatz wurde 30-60 Sek. gevortext und anschließend für 5 Min. bei 13200 rpm zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurde die RNA von den organischen Zellbestandteilen getrennt. Die „aqueous“ Phase, welche die RNA enthielt, wurde in ein steriles Reagiergefäß überführt und das 1.25-fache Volumen an 100%-igem Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde auf einen mirVana-Filter gegeben und für 15 Sek. bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, es folgten drei Waschschrte mit den zwei im Kit zur Verfügung gestellten mirVana-Waschpuffern und eine anschließende Leerzentrifugation des Filters für 1 Min. bei 10000 rpm. Nach Transfer des Filters und der an ihm gebundenen RNA in ein neues steriles Reagiergefäß, wurde die RNA durch die Zugabe von 30 µl ddH₂O (95 °C) eluiert. Der Ansatz wurde 1 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und folgend für 30 Sek. bei 13200 rpm zentrifugiert.

4.2.4.3 DNase Verdau

Nach der RNA Extraktion folgte der DNase-Verdau mit dem Turbo DNA-free Kit (Life Technologies). Dazu wurden 3 µl 10x DNase-Puffer und 1µl TURBO™ DNase (2U/µl) hinzugefügt. Die Reagiergefäße wurden nun für 30 Min. in einen 37 ° C warmen Heizblock gestellt, nachfolgend mit 3 µl DNase Inactivation Reagent für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und für 1.5 Min. bei 13200 rpm zentrifugiert.

Der RNA-Überstand wurde abgenommen, die Konzentration spektralphotometrisch am NanoDrop 2000 (Peqlab Biotechnologie GmbH) bei 260 nm und 280 nm bestimmt und der

Reinheitsgrad der RNA mithilfe des OD260/OD280- Quotienten – bei 2.0 für reine RNA – überprüft.

4.2.5 Reverse Transkription

Aus der isolierten RNA wurde komplementäre DNA (*engl. complementary DNA*, cDNA) synthetisiert. Dabei erfolgte die reverse Transkription für die mittels RNAqueous Total RNA-Isolation Kit isolierte RNA mithilfe des SuperScript III Reverse Transkriptase Kits (Life Technologies) und RNase OUT (Life Technologies). Als Primer wurden Oligo-dT Primer und Random Hexamers (Qiagen) verwendet. Zu Beginn wurden die RNA Proben entsprechend ihrer RNA Konzentration (ng/µl) und der zu synthetisierenden cDNA Menge (z.B. 1 µg) mit ddH₂O auf 10 µl Volumen pro Probe vermengt und zu jeder Probe 3 µl des Mastermix 1 beigefügt. Im Mastercycler gradient (Eppendorf AG) folgte nun ein Inkubationsschritt bei 65 °C für 5 Min. Nach Lagerung der Proben für 1 Min. auf Eis wurden je 7 µl Mastermix 2 hinzugegeben. Unter folgenden Reaktionsbedingungen wurde schließlich der zweite Inkubationsschritt im Mastercycler gestartet: 25°C für 5 Min., 50°C für 4 Min. und 70°C für 15 Min. Die fertige synthetisierte cDNA wurde bei -80 °C weggefroren.

Mastermix 1 (pro Ansatz)	Mastermix 2 (pro Ansatz)
1µl Oligo-dT Primer	4µl 5x First-Strand-Buffer
1µl Random Hexamers	1µl 0,1 M DTT
1µl dNTP	1µl RNase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40U/µl)
	1µl Super Script Reverse Transcriptase (200U/µl)

Tabelle 12: Mastermix Reverse Transkription RNAqueous

Die mittels *mirVana*TM miRNA Isolation Kit isolierte gesamte RNA wurde mit miRNA spezifischen Primern in jeweils spezifische miRNA kodierende cDNA umgeschrieben.

Die RNA wurde auf je 2ng/µl verdünnt, 3µl der Verdünnung in ein Reagiergefäß überführt und 6µl Mastermix (Tab. 13) hinzugefügt. Die Proben wurden daraufhin in einer auf 4°C runtergekühlten Zentrifuge anzentrifugiert und schließlich für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Reaktion im vapo.protect (Eppendorf) unter folgenden Bedingungen gestartet:

30 Min. bei 16°C; 30 Min bei 42°C; 5 Min. bei 85°C; HOLD bei 4°C

Mastermix (pro Ansatz)	Gesamtvolumen 6 µl
ddH ₂ O	0.696 µl
dNTP (100mM)	0.09 µl
MultiScribe RT (50u/µl)	0.6 µl
10x RT Buffer	0.9µl
RNase Inhibitor (20u/µl)	0.114 µl
RT-Primer miR-93	1.8 µl
RT-Primer U47 (Kontrolle)	1.8 µl

Tabelle 13: Mastermix Reverse Transkription *mirVana*

4.2.6 Real-Time-PCR

Die Quantifizierung von miRNA/ mRNA erfolgte mittels quantitativer Echtzeit Polymerase Ketten Reaktion (*engl. Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR v. qPCR*). Ausgehend von einer cDNA Matrize (Template-DNA) kam es im Rahmen der PCR durch Denaturierung des DNA-Doppelstrangs, Primer-Annealing und Elongation zu einer exponentiellen Amplifikation spezifischer Nukleotidsequenzen. Die thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) katalysierte die Reaktion. Die Quantifizierung des PCR-Templates erfolgte durch die Messung von Fluoreszenzsignalen nach der Theorie des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (FRET). Während des Annealings binden fluoreszenzmarkierte TaqMan-Sonden (Hydrolyse-Sonden) und sequenzspezifische Primer (siehe Tab. 6) das zu amplifizierende Fragment. Die Sonden enthalten an ihrer 5'-untranslatierten Region (5'UTR) einen Fluoreszenzfarbstoff (Donor-Fluorochrom) und an ihrem 3'UTR einen Quencher (Acceptor-Fluorochrom), welcher das Fluoreszenzsignal aufhebt. Der Komplementärstrang wird synthetisiert und die Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase hydrolytisch gespalten. Hierdurch konnten die Fluoreszenzsignale nach Überschreiten einer Hintergrundfluoreszenz am Crossing Point (Cp) im LightCycler480 (Roche) detektiert werden.

4.2.6.1 Quantifizierung von mRNA inflammatorischer Gene

Die relative Quantifizierung des PCR-Templates wurde in Doppelbestimmungen unter Verwendung der aus Abschnitt 3.6 zu entnehmenden qPCR-Primer und UPL-Sonden durchgeführt. Die relative mRNA-Expression des Zielgens wurde auf die Expression der Referenzgene TBP (Tata-Box-Bindeprotein) und SDHA (succinale dehydrogenase complex, subunit A) normiert und mithilfe der LightCycler 480 Relative Quantification Software

effizienzkorrigiert. Pro Ansatz und in jedes Well der zur Messung verwendeten 96-Well Platte wurden zunächst 10 ng cDNA-Template, mit ddH₂O auf 5 µl Volumen vermengt, eingesetzt. Anschließend wurden 15 µl Mastermix, bestehend aus 10 µl FastStart Essential DNA Probesmaster (Roche), 0.2 µl des forward Primers (20µM), 0.2 µl des reverse Primers (20µM), 0.2 µl UPL-Sonde (10µM) und 4.4 µl ddH₂O hinzugegeben. Die 96-Well Platte wurde mit Folie überklebt und für 3 Min. bei 2000 rpm zentrifugiert. Die qPCR erfolgte im LightCycler 480 unter folgenden Reaktionsbedingungen: 95°C für 10 Min.; 50 Zyklen: 95°C für 10 Sek., 60°C für 30 Sek., 72°C für 1 Sek.; 40°C für 30 Sek.

4.2.6.2 Quantifizierung von miRNAs

Die relative Quantifizierung des PCR-Templates wurde in Doppelbestimmungen unter Verwendung der TaqMan® MicroRNA Assays (Assay Name: U47, hsa-miR-93-5p, Life Technologies) durchgeführt. Die relative miRNA Expression wurde auf die Expression von *U47* normiert und mithilfe der LightCycler 480 Relative Quantification Software effizienzkorrigiert. Pro Ansatz und in jedes Well der zur Messung verwendeten 96-Well Platte wurden 0.9 ng cDNA-Template, mit ddH₂O auf 5 µl Volumen vermengt, vorgelegt. Anschließend wurden 15 µl Mastermix, bestehend aus 10 µl FastStart Essential DNA Probesmaster (Roche), 1 µl des jeweiligen TaqMan® MicroRNA Assays (miR-93 und U47) und 4 µl ddH₂O hinzugefügt. Die 96-Well Platte wurde mit Folie überklebt und für 3 Min. bei 2000 rpm zentrifugiert. Die Real-Time-PCR erfolgte am LightCycler 480 unter den folgenden Reaktionsbedingungen: 95°C für 10 Minuten; 50 Zyklen: 95°C für 15 Sek., 60°C für 60 Sek.; 40°C für 30 Sek.

4.2.7 MicroArray

MRNA Expressionsanalysen von miR-93/NC transfizierten und mit IL-1β stimulierten U87 Zellen wurden mithilfe einer Microarray Genomanalyse durchgeführt. Microarrays ermöglichen die gleichzeitige Analyse von tausenden Zielnukleinsäuren einer Probe durch sequenzabhängige Hybridisierung mit an der Array-Oberfläche gebundenen DNA-Sonden. Dazu wurde durch IMG M Laboratories (Martinsried) die Affymetrix GeneChip PrimeView Human Gene Expression Microarray slide verwendet, die eine vollständige Abdeckung des Genoms bietet. Hierbei können durch die Verwendung von mehr als 530.000 Sonden mehr als 36.000 Transkripte und Varianten abgefragt werden, die laut RefSeq und UniGene über 20.000 Gene repräsentieren. Zur Durchführung der Array Analyse wurden je drei miR-93/NC RNA Proben an IMG M Laboratories gesandt. Die Anforderungen an die RNA Proben sind Tabelle 14 zu entnehmen.

	Microarray
Probe	Total RNA
Eluiert in	RNase-freies Wasser
Menge	≥ 1 µg
Konzentration	50-200 ng/µl
Volumen	≥ 10 µl
Behälter	1.5 ml Tube

Tabelle 14: Anforderungen an die Proben zur Microarray Analyse bei IMG M Laboratories GmbH

Nach Abschluss des Microarrays erfolgte eine bioinformatische Auswertung durch den Bioinformatiker der Arbeitsgruppe.

4.3 Klonierung von 3'UTR-Sequenzen in den psiCHECK™-2 Vektor

Die 3'UTR-Sequenzen verschiedener Zielgene wurden in die *Multiple Cloning Site* (MCS) des psiCHECK™-2 Vektors (Promega) kloniert, um durch entsprechende Kotransfektionsversuche und Luciferaseaktivitäts-Bestimmungen direkte miR-93 Interaktionen mit den Zielsequenzen zu ermitteln. Die 3'UTRs wurden dazu zuerst mittels qPCR aus 100 ng gDNA und den zugehörigen Primern amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in einen Topoisomerase-Vektor pSCB-amp/kan (StrataClone Ultra Blunt PCR Cloning Kit, Stratagene) ligiert und letztendendes in die NotI-HF und XhoI bzw. PmeI und NotI-HF Restriktionsschnittstelle des psiCHECK™-2 Vektors kloniert (siehe Abbildung 3). Im Folgenden werden die einzelnen Klonierungsschritte genauer erläutert.

4.3.1 qPCR mit genomischer DNA

Die qPCR erfolgte unter Verwendung der entsprechenden 3'UTR Klonierungsprimer, genomischer DNA, sowie einer PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase aus dem StrataClone Ultra Blunt PCR Cloning Kit (Stratagene). Der Reaktionsansatz setzte sich aus 100 ng gDNA, je 1 µl forward und reverse Primer (10 µM), 1 µl dNTP mix (10 µM), 1 µl PfuUltra Polymerase (5U/µl) und 5 µl 10x PfuUltra Polymerase Reaktionspuffer zusammen und wurde mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 µl gebracht. Der Ansatz wurde 5-fach hergestellt und auf einzelne Reagiergefäße aufgeteilt, um verschiedene Primerhybridisierungstemperaturen mittels Temperaturgradienten zu prüfen. Folgende Reaktionsbedingungen wurden im vapo.protect (Eppendorf) eingestellt: 95°C für 2 Min; 35 Zyklen: 95°C für 20 Sek., 58°C-63°C für 20 Sek., 72°C für 30 Sek.; 72°C für 3 Min. Anschließend wurde die optimale

Primerbindungstemperatur für die Amplifikation des PCR-Produktes mittels analytischer Gelelektrophorese überprüft.

4.3.2 Analytische Gelelektrophorese

Je nach Größe des nachzuweisenden Inserts wurde ein 1-3%-iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurden entsprechend 2-6 Agarose Tabletten in einen Kolben überführt und mit 100 ml 1x TBE Puffer vermischt. Nach zweimaligem Aufkochen in der Mikrowelle bei 600 W, wurden 2 µl peqGREEN DNA- und RNA-Farbstoff, bzw. 7,5 µl Ethidiumbromid Farbstoff hinzugefügt. Das Gel wurde mit kleinen und großen Kämmen, je nach Menge der elektrophoretisch aufzutrennenden Probe, gegossen. Anschließend wurde das Gel in das mit 1x TBE Puffer gefüllte Sub-Cell GT Elektrophorese System (Bio-Rad) überführt. 13 µl der 100 bp (Thermo Scientific) bzw. 1 kb (Promega) DNA-Molekulargewichtsmarker und 25-50 µl der mit 6x Ladepuffer (Promega) im Verhältnis 1:6 vermischten und zu untersuchenden Probe wurden in die Geltaschen pipettiert. Nun erfolgte die elektrophoretische Auftrennung bei 100- 120V für etwa 60 Min. Durch das UV Gel-Dokumentationssystem (Peqlab) konnten die Banden schließlich dargestellt werden. Das PCR Produkt, welches mit der optimalen Primerhybridisierungstemperatur amplifiziert wurde, war an der deutlich sichtbaren Bande zu erkennen und wurde für die folgende Ligation in den Topoisomerase- Vektor verwendet.

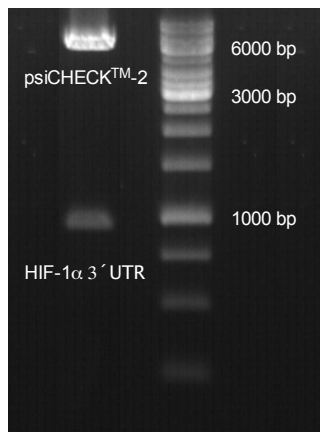


Abbildung 2: Beispielhafte Gelelektrophorese nach analytischem Restriktionsverdau

Nach Klonierung des 3'UTRs in die MCS des Vektors erfolgte ein analytischer Restriktionsverdau mit den Enzymen XhoI und NotI-HF. Die anschließende Gelelektrophorese zeigte die Auftrennung der Segmente: psiCHECK™-2 (6273 bp) und HIF-1α (930 bp)

4.3.3 Ligation in den Topoisomerase-Vektor und Transformation in E.coli

Das PCR-Produkt wurde mittels StrataClone™ Ultra Blunt PCR Cloning Kit (Stratagene) (Stratagene) in den Topoisomerase-Vektor pSCB-amp/kan ligiert. Dazu wurden 2 µl des 1:10 verdünnten PCR-Produktes mit 1 µl Strata Clone Blunt Vektor Mix und 3 µl Strata Clone Blunt Cloning Buffer in einem sterilen Reagiergefäß vermengt. Während der 30-minütigen

Inkubation bei Raumtemperatur verbinden sich die durch die Pfu Polymerase katalysierten *blunt ends* (glatte DNA Doppelstränge ohne Überhang) des PCR-Produktes mit dem linearen Topoisomerase-Vektor. Nach Ablauf der Ligation wurde der Ansatz in StrataClone SoloPack Competent Cells, *Escherichia coli* (E. coli) K12 Stamm (Stratagene) transformiert. Diese exprimieren das Enzym Cre recombinase, welches den linearen Ligationsansatz in einen ringförmigen Vektor umwandelt. 50 µl E.coli Bakterien wurden dazu in ein auf Eis gekühltes 13 ml Tube gegeben und der gesamte Ligationsansatz hinzupipettiert. Nach vorsichtigem Schütteln des Röhrchens wurde der Ansatz für 20 Min. auf Eis inkubiert. Ein anschließender Hitzeschock für 45 Sek. bei 42°C im Wasserbad permeabilisierte die Bakterienmembran und erlaubte die Aufnahme der Vektor-DNA. Nach 2-minütiger Inkubation auf Eis wurden 250 µl auf 42°C vorgewärmtes LB-Medium zugegeben. Schließlich wurde der Transformationsansatz für 1 Stunde bei 37°C und 225 rpm in der Inkubationshaube geschüttelt. Die Zellen wurden auf Ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Einzelne Bakterienkolonien konnten am Folgetag mit einer Impfschlinge gepickt werden. Die Spitze der Impfschlinge wurde über Nacht in einem 13 ml Tube mit 3 ml LB-Medium und 3 µl Ampicillin inkubiert, um daraus die Bakteriensuspension für die Plasmidpräparation zu generieren.

4.3.4 Plasmidpräparation

Die Plasmid-DNA wurde mittels peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab) oder Pure Yield™ Plasmid Midiprep System (Promega) gewonnen. Dabei wurden die Bakterien alkalisch lysiert, die DNA an eine Silikamembran gebunden und nach mehreren Waschrufen in ddH₂O eluiert. Eine Minipräparation wurde für eine geringe DNA-Ausbeute zwischen 15-25 µg verwendet. Dazu wurden 2 ml der oben generierten Bakteriensuspension in ein Reagiergefäß überführt und für 10 Min. bei 5000 rpm zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde in 250 µl Solution I resuspendiert, 250 µl Solution II und 350 µl Solution III wurden dazugegeben, nachdem das Reagiergefäß je 10x vorsichtig invertiert wurde. Nach erneuter Zentrifugation für 10 Min. bei 10000 rpm, wurde der Überstand abgenommen und auf ein PerfectBind DNA Column pipettiert. Es wurde 1 Min. bei 10000 rpm zentrifugiert, das Effluat verworfen, drei Waschrufen mit den zwei im Kit zur Verfügung gestellten Waschpuffern vollzogen und eine anschließende Leerzentrifugation des Filters für 2 Min. bei 10000 rpm durchgeführt. Schließlich wurde die DNA durch die Zugabe von 50-100 µl ddH₂O eluiert. Der DNA-Überstand wurde abgenommen und die Konzentration spektralphotometrisch am NanoDrop 2000 bestimmt.

Zur Gewinnung von Plasmidmengen zwischen 100-200 µg erfolgte die Präparation mit dem

Pure Yield™ Plasmid Midiprep System (Promega). 100 µl der oben generierten Bakterienzellsuspension wurden in 100 ml LB-Medium und 100 µl Ampicillin über Nacht bei 37 °C und 125 rpm geschüttelt und inkubiert. Die Zellsuspension wurde am Folgetag auf zwei 50 ml Falcons aufgeteilt und für 5 Min. bei 5000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets in je 3 ml Cell Resuspension Solution gelöst und in einem 50 ml Glasröhrchen zusammengeführt. Nach Zugabe von 6 ml Cell Lysis Solution wurde das Röhrchen 3-5x invertiert, der Ansatz für 3 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und 10 ml Neutralization Solution zugegeben. Das Glas-Röhrchen wurde dann für 12 Min. in der Ultrazentrifuge (Kontron) bei 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein PureYield™ Clearing Column überführt. Mittels Vakuumanlage (Vac-Man Laboratory Vacuum Manifold, Promega) wurde der klare Überstand auf ein PureYield™ Binding Column überführt, und die Plasmid-DNA auf eine Membran gebunden. Es folgten Waschschrte mit den im Kit zur Verfügung gestellten Waschpuffern. Die an der Membran gebundene Plasmid-DNA wurde schließlich im Eluator Vacuum Elution Device durch die Zugabe von 300 µl ddH₂O eluiert.

4.3.5 Restriktionsverdau

Zur Klonierung des 3'UTR Amplikons in die MCS des psiCHECK™-2 Vektors wurde zunächst der Topoisomerase-Vektor mithilfe von Restriktionsendonukleasen verdaut. Die 3'UTR DNA-Sequenz wurde dadurch mit *sticky ends* (klebrige DNA Doppelstränge mit Überhang) aus diesem herausgeschnitten. 4 µg der Plasmid-DNA wurden mit je 0.5 µl der für die Sequenz spezifischen Restriktionsendonukleasen (siehe Tab. 7), 5 µl CutSmart® Buffer und ddH₂O auf 50 µl Gesamtvolumen vermengt. Der psiCHECK™-2 Vektor wurde gleichermaßen mit den Restriktionsenzymen geschnitten. Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Es folgte die Aufreinigung des gewünschten DNA-Fragments und des geschnittenen Vektors mittels präparativer Gelelektrophorese und Gelaufreinigung.

4.3.6 Präparative Gelelektrophorese und Gelaufreinigung

Die präparative Gelelektrophorese erfolgte zunächst wie unter 4.3.2 beschrieben. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proben und Visualisierung der DNA-Fragmente unter UV-Licht wurden die gesuchten Banden (3'UTR Insert und geschnittener psiCHECK™-2 Vektor) mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein steriles 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Die Gelbanden wurden mit 1 µl Binding Solution pro mg Gel bei 56 °C im Heizblock lysiert. Die Suspension wurde auf ein SV Minicolumn gegeben. Nach zwei

Waschschritten wurde die auf der Membran gebundene DNA in 30 µl ddH₂O eluiert und die Konzentration spektralphotometrisch am NanoDrop 2000 bestimmt.

4.3.7 Ligation in den psiCHECK™-2 Vektor

Die DNA-Sequenz des 3'UTR Inserts wurde schließlich in den mit denselben Restriktionsenzymen geschnittenen psiCHECK™-2 Vektor ligiert. Die Verbindung der beiden DNA Stränge durch den Phosphat -und Zuckerrest erfolgte dabei während der Inkubation durch die enzymatische Reaktion mit der T4 Ligase (Promega).

Nach Herstellerangaben konnte mit folgender Formel die Menge an Insert DNA bestimmt werden (Molverhältnis von Vektor:Insert entspricht 1:3; 100 ng psiCHECK™-2 Vektor DNA (Größe: 6273 bp)):

$$\frac{\text{Vektormenge (ng)} \times \text{Größe des Inserts (kb)}}{\text{Größe des Vektors (kb)}} \times \text{Molverhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = \text{Insertmenge (ng)}$$

Pro Ligationsansatz wurden zu Vektor und Insert DNA noch 1 µl T4 Ligase, 1 µl T4 Ligase-Puffer und ddH₂O auf ein Endvolumen von 10 µl hinzugegeben. Es folgte die Inkubation bei 4 °C über Nacht. Es folgte die Transformation in E.coli und Plasmidpräparation wie unter 4.3.3 und 4.3.4 beschrieben.

4.3.8 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzanalysen wurden durch die Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg durchgeführt. Dazu wurden 50-100 ng/µl Plasmid-DNA und 10 pmol/µl psiCHECK™-2 Sequenzierungsprimer (Psi Seq, 5' acctgggttctttccaac 3') in 15 µl Volumen verdünnt. Das Sequenzierungsergebnis wurde mithilfe der BLAST®- Basic Local Alignment Search Tool Software ausgewertet.

4.4 Dualer Luciferase-Reporter-Gen-Assay

Mit dem Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega) konnte die Luciferase-Reporter-Gen-Aktivität nach transienter Ko-Transfektion von HEK-293 Zellen mit miR-93/NC und dem entsprechend kloniertem psiCHECK™-2 Reportervektor bestimmt werden. Der psiCHECK™-2 Vektor exprimiert konstant ein Gen für die Firefly-Luciferase hLuc+ und enthält zudem ein Reporter-Gen für die Renilla-Luciferase hRluc. Die 3'UTR-Sequenzen der verschiedenen Zielgene wurden wie oben beschrieben in die MCS des Vektors, am 3'Ende des hRluc

Reporter Gens kloniert. Die Bindung von miR-93 im Bereich der subklonierten Zielgen 3'-UTR führt zu einer Degradation der mRNA des fusionierten Reporter-Target Gens und zu einer entsprechenden Abnahme der Renilla Luciferase Aktivität, während die Leuchtkraft der Firefly-Luciferase als interne Kontrolle unbeeinträchtigt bleibt. Dadurch ließ sich eine potenzielle direkte miR-93 Regulation der Zielgene quantifizieren.

Zur Bestimmung der Luciferase-Reportergen-Aktivität wurden HEK-293 Zellen mit miR-93/NC und dem entsprechend kloniertem psiCHECK™-2 Reportervektor transient ko-transfiziert. Nach 40 Stunden Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und in 20 µl DMEM-Medium resuspendiert. 15 µl der jeweiligen Zellsuspension wurden in eine 96-Well Platte überführt, 15 µl Dual-Glo Luciferase Reagenz hinzugefügt und für 10 Min. im Dunkeln inkubiert. Daraufhin erfolgte die luminometrische Firefly-Luciferase Messung am Filter Max F3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices). Zur Messung der Renilla-Luciferase wurden Dual-Glo Stop and Glo Substrate mit Dual-Glo Stop and Glo Buffer in einem Verhältnis von 1:100 gemischt und je 15 µl in die Wells pipettiert. Nach Inkubation von 10 Minuten im Dunkeln erfolgte die Renilla-Luciferase Messung.

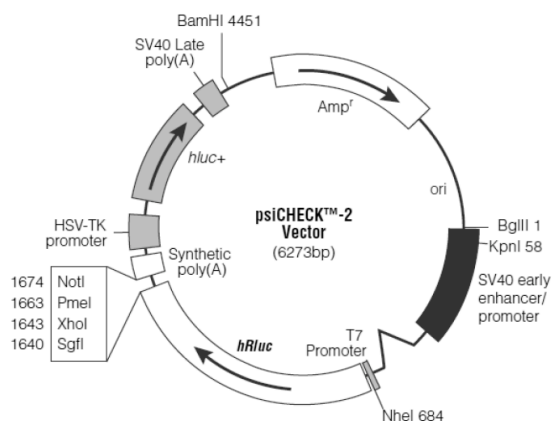


Abbildung 3: Aufbau des psiCHECK™-2 Vektors (Promega GmbH [95])

Am 3'Ende des Renilla Luciferase Reporter-Gens (hRluc) befindet sich die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors. Durch Restriktionsenzyme NotI, PmeI, XhoI und SgfI wird diese geschnitten und das hRluc Gen mit dem zu untersuchenden 3'UTR fusioniert. Eine Bindung simultan transfizierter miR-93 führt zur Degradation der mRNA und zu einer Verringerung der zu messenden Renilla-Lumineszenz. Als Kontrolle dient die konstant exprimierte Firefly Luciferase (hLuc+).

4.5 Gerichtete Mutagenese der miR-93 Bindestellen

Um den Einfluss unterschiedlicher miR-93 Bindestellen auf die mRNA Expression von Zielgenen zu untersuchen, wurden gezielt miR-93 Bindestellen in den jeweiligen 3'UTR-Sequenzen mittels qPCR mutiert und die Unterschiede in der Luciferaseaktivität bestimmt. Hierzu wurde das QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) verwendet. Das Prinzip der Mutagenese wird anhand der zwei putativen miR-93 Bindestellen im 3'UTR von Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2 (Map3K2) näher erläutert. Als

Template für die Einzelmutationen diente Plasmid-DNA (psiCHECK™-2 Vektor) mit dem Map3K2 3'-UTR Insert. (hsa-miR-93-5p Seed Sequenz: 5' caaagugcuguucgugcagguag 3'; miR-93 Bindestelle: 5' gcacttt 3'):

```
5' gc tgatgaactc ttaaggcaca tgttgtgca ttactactag cagccagtaa cctctcctgt gcctctacc agctcccatc
tattcattca cctctctct gactgcactt ttcttttt taaaaaaga gagatggggg agaaaaaaga caagagggaa
agtatttctc ttgattcttg gtaaatttg ttaataata ataatacct aaattttta tatttaactc tttttccct tacaagaact
tgaagtttt tttttaatt ttataatgt actgatgtgg tcagagaga taagcactt tagtacatag tcactcttt tagtacaac
aatcatttg gaatacctaa agattgtaga gtcattccct ctactactga cacatcagtg acgatgggaa gacatggaaa
acaaggagaa gaaaatgatg tataatttg agtttttagt gatagtattt aaaatatatc ctatttttg ggggtgagcc
ctaaactta gtttaggga ggtactcaac ttaaagaata taggtttctt cttatatctg tattcttag atcctaacc ctgtctacca
acc 3'
```

Für beide Bindestellen wurden Mutageneseprimer hergestellt (siehe Tab. 6). Dabei wurde die miR-93 Bindestellensequenz mittels qPCR von 5' gcacttt 3' zu 5' **gcgtttt** 3' mutiert. Ein qPCR Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: 50 ng der Map3K2 Wildtyp Plasmid-DNA wurden mit 2.5 µl 10x Reaktionspuffer, 0.5 µl dNTP, 0.75 µl Quick Solution Reagent, 0.5 µl Lightning Enzyme und 0.5 µl des jeweiligen forward und reverse Primers (getrennt für Bindestelle 1 und 2) vermengt und mit ddH₂O auf 25 µl Volumen aufgefüllt. Folgende Reaktionsbedingungen wurden im vapo.protect (Eppendorf) eingestellt und die qPCR gestartet: 95°C für 2 Min.; 18 Zyklen: 95°C für 20 Sek., 60°C für 10 Sek., 68°C für 30 Sek./kb Plasmid; 68°C für 5 Min.

Das PCR-Produkt der mutierten DNA-Sequenz wurde anschließend mit 2 µl der Dpn I Restriktionsendonuklease verdaut, um die E.coli Plasmid DNA zu entfernen und lediglich die mutierte DNA zu selektionieren. Es folgte eine Transformation in XL10-Gold ultracompetent cells (Stratagene). Dazu wurden 45 µl Zellsuspension mit 2 µl β-Mercaptoethanol vermengt und der Ansatz für 2 Min. auf Eis inkubiert. 2 µl der mutierten DNA wurden hinzugefügt und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation durch Hitzeschock bei 42°C für 30 Sek., die 2-minütige Lagerung des Ansatzes auf Eis und die Zugabe von 500 µl LB-Medium. Die Röhren wurden für 1 Stunde bei 225 rpm im Schüttler inkubiert und auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausplattiert. Es folgten wie vorher bereits ausführlich beschrieben das Picken und Schütteln von Einzelkolonien, die Plasmidpräparation und Sequenzierung, wonach schließlich die mutierte Plasmid-DNA gewonnen wurde.

4.6 Proteinbiochemische Methoden

4.6.1 Proteinextraktion und Proteinbestimmung mittels BCA-Assay

Mit dem Nuclear extract Kit (Actif Motif) wurden Zellproteinextrakte zur nachfolgenden Proteinbestimmung gewonnen. Alle Reagenzien und Reagiergefäße wurden gekühlt und die Zentrifuge auf 4°C eingestellt. Zunächst wurden die Zellen mit eisgekühltem PBS/Phosphatase Inhibitor gewaschen. Anschließend wurden die Zellen unter Zugabe von 1 ml PBS/Phosphatase Inhibitor mit einem Zellschaber aus dem Well gelöst und in ein vorgekühltes steriles Reagiergefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 200 xg für 5 Min. wurde der Überstand verworfen und das Pellet auf Eis gestellt. Für Gesamtzellproteinextrakte (*engl. whole-cell extract, WC*) wurde das Pellet in 100 µl Complete Lysis Buffer lysiert, 10 Sek. gevortext und für 30 Min. auf Eis und einem Schütteltisch bei 150 rpm inkubiert. Die Zellyse wurde lichtmikroskopisch überprüft und der Ansatz daraufhin für 30 Sek. höchstmöglich gevortext. Nach Zentrifugation für 20 Min. bei 14000 xg wurde der Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration mittels Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) im FilterMax F3 MultiMode Microplate Reader bestimmt. Die Absorption bei 562 nm ist dabei nahezu linear zur steigenden Proteinkonzentration. Nach Herstellung der Albumin Verdünnungsreihe in H₂O als Referenz (2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25, 0 µg/ml BSA), wurden je 10 µl Albumin-Standard oder Protein-Lysat in Einzel- oder Doppelbestimmung in eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. 200 µl BCA Working Reagent (WR) wurde hinzugefügt, der aus den BCA Reagenzien A und B im Verhältnis 50:1 hergestellt wurde. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Proteinkonzentration bei 560 nm im FilterMax F3 MultiMode Microplate Reader bestimmt.

4.6.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zum quantitativen Nachweis von Proteinen aus Zellüberständen wurden die LEGEND MAX™ Human CXCL5, IL-8 und IL-6 ELISA Kits (BioLegend) verwendet. Darin enthalten war eine mit spezifischen IL-6/ IL-8 und CXCL5 Antikörpern beschichtete 96-Well Mikrotiterplatte. Nach dem Prinzip des Sandwich ELISAs wurde zunächst das nachzuweisende Antigen aus dem Zellüberstand in die mit „Coating“ Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurde ein biotinylierter „Detection“ Antikörper hinzugefügt. Im nächsten Schritt wurde ein an Avidin gebundenes Enzym (Horseradish Peroxidase, HRP) mit dem biotinylierten Sekundärantikörper gekoppelt. Schließlich wurde ein für HRP spezifisches Substrat zugeführt, der Farbumschlag durch ein Photometer gemessen und so die Konzentration des Proteins bestimmt.

Das Prinzip des ELISAs soll am Beispiel des BioLegend's LEGEND MAX™ Human IL-8 ELISA Kit näher dargestellt werden. Vor Beginn des ELISAs hatten alle Reagenzien Raumtemperatur und folgende Verdünnungen wurden hergestellt:

Eine 1x Wash Buffer Verdünnung wurde hergestellt, in dem 950 ml ddH₂O mit 50 ml 20x Wash Buffer vermischt wurde. Alle weiteren Verdünnungen wurden mit Assay Buffer D hergestellt. Der lyophilisierte Human IL-8 Standard wurde entsprechend der Herstellerangaben auf 20 ng/ml verdünnt, um die „standard stock solution“ herzustellen. Die Zellüberstände wurden 1:20 verdünnt. Um die Standardkurve herzustellen wurden aus der Standard Stock Solution 250 µl Standardlösungen in verschiedenen IL-8 Konzentrationen (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6 pg/ml) hergestellt.

Die Mikrotiterplatte wurde 4x mit 300 µl 1x Wash Buffer pro Well gewaschen. 50 µl Assay Buffer D wurde in die Wells übertragen und 50 µl der Standards bzw. der Proben hinzugefügt. Die Platte wurde mit Plate Sealer Folie überklebt, für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und dabei bei 200 rpm geschüttelt. Der Inhalt der Platte wurde nachfolgend entfernt und die Wells vier Mal gewaschen. Somit verblieben nur die Antikörper-gebundenen IL-8 Proteine in den Wells. Nun wurden 100 µl des biotinylierten Human IL-8 Detection Antikörper (Sekundärantikörper) hinzugegeben und für 1 Stunde bei 200 rpm inkubiert. Es folgten erneut vier Waschschrte. 100 µl Avidin-HRP wurden in jedes Well pipettiert, der Sekundärantikörper so durch die starke Biotin-Avidin Bindung mit dem Enzym markiert und 30 Min. bei Raumtemperatur und 200 rpm inkubiert. Nach weiteren fünf Waschschrten wurden 100 µl/Well der enzyspezifischen Substrat Solution F hinzupipettiert und die Platte für 20 Min. in Dunkelheit inkubiert. Das Substrat in den Wells färbte sich entsprechend der IL-8 Konzentration und durch die vom Enzym katalysierte chemische Reaktion blau. Nach der Inkubation wurden je 100 µl Stop Solution beigefügt, um die chemische Reaktion zu beenden. Es folgte ein Farbumschlag von blau zu gelb. Nun konnte im FilterMax F3 MultiMode Microplate Reader die optische Dichte bei 450 nm bestimmt und anhand dieser Werte die Konzentration des Proteins in pg/ml ermittelt werden.

4.6.3 Multiplex Protein Assay

Durch die Verwendung eines Multiplex Assays konnte die Expression mehrerer Proteine aus einer Probe Zellüberstand zeitgleich bestimmt werden. Die Technologie beruht auf der Verwendung von unterschiedlich farbmarkierten magnetischen Beads, die jeweils an einen zielspezifischen Antikörper gekoppelt werden können. Mehrere Antikörper-konjugierte, farbmarkierte Beads können dann gleichzeitig in ein Well der zu untersuchenden Probe hinzugegeben werden. Nach Bindung des Antigens wird ein spezifischer farbmarkierter Reporter hinzugegeben und die Proteinkonzentration quantifiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das ProcartaPlex Mix&Match Human Kit (Thermo Fisher) verwendet. Die zu untersuchenden Targets wurden dem Hersteller mitgeteilt, und die benötigten Standards zur Proteinbestimmung bestellt. Die unverdünnte Standardkonzentration von IL-8 betrug 9850 pg/ml, IL-6 37800 pg/ml, CXCL5 38900 pg/ml, G-CSF 61700 pg/ml und LIF 20300 pg/ml. Die fünf unverdünnten Standards wurden zusammengeführt und gepoolt. Nun erfolgten jeweils 4-fach Verdünnungen der gepoolten Standards mit Zellmedium, sodass Standard 1 die vom Hersteller angegebene Proteinkonzentration enthielt und Standard 8 lediglich 200 µl Medium (Blank). Anschließend wurden in die 96-Well Platte 50 µl/ Well der magnetischen Beads vorgelegt. Die Platte wurde in den Hand Held Magnetic Plate Washer (Thermo Fisher) gespannt. Durch das Magnetfeld akkumulierten die Beads nach 2 Min. am Boden der Wells. Der Überstand wurde abgekippt und die Platte mit 150 µl Waschpuffer/ Well gewaschen. Die 96-Well Platte wurde aus der Magnethalterung entfernt und 50 µl des jeweiligen Standards bzw. der zu untersuchenden Probe in die jeweiligen Wells pipettiert. Es folgte die lichtgeschützte Inkubation (Raumtemperatur) bei 500 rpm für 2 Stunden auf dem Schüttler. Nacheinander wurden die mitgelieferten Detection Antibodys, Streptavidin-PE Lösung und Reading Buffer hinzugefügt, mit jeweils folgenden Waschschritten und lichtgeschützter Inkubation. Die Proteinkonzentrationen konnten schließlich im LUMINEX 200 (Luminex Corp.) mithilfe der xPONENT Software (Luminex Corp.) in pg/ml ermittelt werden.

4.6.4 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese und Western Blot

Durch die SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese können Polypeptide anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden. Ein elektrisches Feld induziert dabei den Proteintransfer vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-haltige Membran. Diese wird anschließend durch targetspezifische Antikörper prozessiert und mithilfe von Sekundärantikörpern und Detektionsreagenzien sichtbar gemacht.

Beispielhaft wird die Methode anhand des HIF-1 α Western Blots erläutert:

Die extrahierten Proteine wurden zunächst durch Erhitzung bei 95 °C und Zugabe des Detergens SDS denaturiert. Dabei erhielten die Proteine durch ihre Interaktion mit SDS eine zu ihrer Länge und ihrem Molekulargewicht proportional negative Ladung. Bei Anlage eines elektrischen Feldes im Rahmen der Elektrophorese im SDS-Polyacrylamidgel wanderten die Proteine deshalb entsprechend ihres Molekulargewichts unterschiedlich schnell zur positiv geladenen Anode. Das dazu verwendete Polyacrylamidgel bestand aus einem weitporigen 6%-igen Sammelgel und einem engerporigen 10%-igen Trenngel. Die Mini-Protean System

Casting Stand Gelkammer (Bio-Rad) wurde vorschriftsmäßig zusammengebaut und die gemischte Trenngel-Acrylamidlösung zwischen die Glasplatten aufgetragen. Daraufhin wurde mit 1 ml Isopropanol überschichtet, um Luftblasen zu entfernen. Nachdem das Trenngel polymerisierte, wurde das Isopropanol abdekantiert, das Sammelgel gegossen und der Geltaschen-Kamm (für 10 Proben) eingesetzt. Die Auftrennung von 30-50 µg der denaturierten Proteine erfolgte in der mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllten Elektrophorese-Kammer. Der PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) wurde als interne Größenkontrolle aufgetragen. Bei 300 mA wurde für etwa 2 Stunden eine Spannung von 150 V am Standard Power Pack P25 (Biometra) appliziert.

Im Rahmen des anschließend Western Blots wurden die in dem Gel aufgetrennten Proteine unter Verwendung der Mini Trans- Blot Cell-Apparatur (Bio-Rad) für weitere 2 Stunden bei 300 mA und 25 V in 1x Transferpuffer auf eine PVDF-Membran (Immobilion Transfermembran, Merck) übertragen. Der Proteintransfer wurde durch Färbung der Membran mit PonceauS-Rot kontrolliert und abschließend dreifach mit TBS-T gewaschen.

Nach dem Proteintransfer auf die PVDF-Membran, wurde diese zunächst für 1 Stunde bei Raumtemperatur in Blockpuffer (5% Magermilch in TBS-T) inkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindestellen zu blockieren. Die folgenden Verdünnungs- und Waschschrte wurden mit 1%-iger Magermilch in TBS-T durchgeführt. Der Primärantikörper Anti-Human HIF-1 α Clone 54/HIF-1 α (RUO) (BD Biosciences) wurde im Verhältnis 1:1000 verdünnt und bei 4°C über Nacht auf die Membran gegeben. Nach zweimaligem Waschen für je 15 Min. wurde am Folgetag der Sekundärantikörper anti-mouse IgG HRP-linked Antikörper (Cell Signaling) im Verhältnis von 1:2000 auf die Membran gegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei Waschrte mit TBS-T, bevor die Membran zur Detektion der Proteinbanden in 20x LumiGlo-Reagenz und 20x Peroxide (Cell Signaling) gelegt wurde. Mittels Chemilumineszenz wurden die Banden nach Auflage eines Röntgenfilms (Agfa-Gevaert) im AGFA Curix 60 (Agfa-Gevaert) entwickelt.

Die Ladekontrolle erfolgte mit β -Actin Mouse mAb (Cell Signaling) als Primärantikörper und anti-mouse IgG HRP-linked Antikörper (Cell Signaling) als Sekundärantikörper, beide im Verhältnis 1:2000. Die Membran wurde zunächst mit TBS-T gewaschen, anschließend zweimal für 10 Min. mit Stripping-Puffer inkubiert und nachfolgend wieder mit TBS-T gewaschen. Die immunchemische Darstellung erfolgte entsprechend der oben genannten Schritte.

4.7 Methoden zur Beurteilung der Zellmorphologie

4.7.1 Migrationsassay

Das Prinzip der Methode besteht in einer Trennung zweier miteinander verbundener Wells durch ein Insert. Dieses trennt die Wells durch einen 500 µm großen Spalt voneinander. Nach Entfernung des Inserts ist die Migration von Zellen in den 500 µm großen Spalt möglich. Je nach Zelleigenschaft, oder wie in diesem Fall durch die Konditionierung mit einem speziellem Medium, kann eine höhere oder geringere Migrationstendenz erkannt werden. In diesem Experiment wurden 70.000 native U87 Zellen/ Well in einem 2-Well Culture Insert (ibidi) für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Inserts wurden entfernt und die Baseline-Aufnahmen mithilfe eines inversen Phasenkontrastmikroskops (Olympus IX50) erstellt. Die Zellen wurden nun für weitere 24 Stunden mit dem Überstand von miR-93 transfizierten U87-Zellen inkubiert, die zuvor mit IL-1β stimuliert und in in 5% O₂ inkubiert wurden. Anschließend wurden mikroskopische Aufnahmen der Zellmigration in den 500 µm großen Spalt erstellt.

4.7.2 Tube Formation Assay

Mithilfe eines Tube Formation Assay kann das angiogenetische Potenzial von Endothelzellen unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden. In diesem Fall wurden HUVEC Endothelzellen (Thermo Fisher) mit dem Überstand von miR-93 transfizierten U87-Zellen inkubiert, die zuvor mit IL-1β stimuliert und in in 5% O₂ inkubiert wurden. Zunächst wurde dazu die Geltrex Basement Membrane Matrix (Thermo Fisher) über Nacht bei 4°C im Eisbad im Kühlschrank aufgetaut. Zeitgleich wurde die µ slide Angiogenesis (ibidi) über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am Folgetag erfolgte die blasenfreie Zugabe der Geltrex Matrix (10µl/Well) und die Inkubation der µ slide für 45 Minuten im Brutschrank zur Polymerisation. 10.000 HUVEC Zellen/ Well wurden in 50 µl Zellsuspension hinzugegeben. Nach 2 Stunden waren die Zellen adhärent und es wurden Baseline-Aufnahmen mit einem inversen Phasenkontrastmikroskop (Olympus IX50) erstellt. Die HUVECs wurden für weitere 4 Stunden mit dem oben beschriebenen Zellüberstand inkubiert. Abschließend folgten vergleichende Aufnahmen mit dem Phasenkontrastmikroskop.

4.8 Statistische und bioinformatische Methoden

Potenzielle miR-93-mRNA Bindestellen an ausgewählten Zielgenen wurden mithilfe der Vorhersageprogramme TargetScanHuman 6.2 (<http://www.targetscan.org/>) und PITA Online microRNA prediction tool (http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html)

identifiziert. Die DNA-Sequenz der 3'UTRs wurde mithilfe von PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) bestimmt und 3'UTR Primer mithilfe von PRIMER3 (<http://primer3.ut.ee/>) erstellt. Die Schnittstellen von Restriktionsenzymen wurden mit NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) beurteilt.

Die Software GraphPad Prism Version 6 (GraphPad Software, Inc.) wurde zur Daten-, und statistischen Auswertung verwendet. Dabei wurden die Signifikanzniveaus folgendermaßen festgelegt: $p < 0.05$ als statistisch signifikant (*), $p < 0.01$ als statistisch hochsignifikant (**). Die in dem Promotionsprojekt beschriebenen Experimente wurden, sofern nicht anders vermerkt, als Mittelwerte \pm *standard error of the mean* (SEM) dargestellt.

Bei Messreihen wurde im Allgemeinen in Triplikaten gemessen. Die Überprüfung auf Normalverteilung der Mittelwerte, aus den gemessenen Triplikaten, erfolgte mittels Shapiro–Wilk Test. Für die Evaluation statistisch signifikanter Unterschiede bei normalverteilten Daten wurde der Student's t-test für verbundene bzw. unverbundene Stichproben angewandt. Bei nicht-parametrischer Verteilung der Mittelwerte erfolgte zur Ermittlung einer statistisch signifikanten Differenz der Mann-Whitney U-Test für unverbundene bzw. der Wilcoxon-Signed-Rank-Test für verbundene Stichproben.

Die grafische Darstellung der mRNA-Expressionsraten erfolgte in einigen Fällen als Vielfaches einer Negativkontrolle (= fold change). Zu diesem Zweck wurden sämtliche Werte auf den Mittelwert der dazugehörigen Negativkontrollen normalisiert. In einigen Fällen, beispielsweise für die Quantifizierung der Luciferase-Reportergen-Aktivität, oder der relativen mRNA Expression untersuchter Zielgene, wurde das prozentuale Verhältnis zur Negativkontrolle berechnet. Hierfür wurden die Einzelwerte auf den maximalen Wert der Renilla-Luciferase-Reportergen-Aktivität, bzw. der Transfektions-Negativkontrolle, von 100% normalisiert.

Für Western Blot Analysen, Migrations- und Tube Formation Assays wurden repräsentative Beispielabbildungen zur Darstellung der Ergebnisse verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 Eine proinflammatorische Mikroumgebung führt zur Induktion einer inflammatorischen Genexpression in GBM-Zelllinien

Für folgende Gene konnte bislang eine Relevanz in inflammatorischen Signalwegen im GBM gezeigt werden:

Gen	Funktion	Referenz
Cyclooxygenase 2 (COX2)	Prostaglandinsynthese; Induzierbar durch inflammatorische Stimuli und Wachstumsfaktoren, wird mit Tumorigenese assoziiert.	[96,97]
C-X-C motif chemokine 5 (CXCL5)	Rekrutierung von neutrophilen Zellen; Förderung von Angiogenese, Tumorzellproliferation und Migration.	[98,99]
Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)	Steuert die Produktion, Differenzierung und Funktion von Granulozyten. GBM Zellen sezernieren G-CSF und verursachen dadurch eine Verschiebung der Hämatopoese hin zu Granulozyten und weg von Lymphozyten. Dies führt zu der für GBMs charakteristischen Lymphopenie und Immunsuppression.	[100]
Interleukin-1 β (IL-1 β)	Zentraler Bestandteil des inflammatorischen GBM Milieus und Induktor weiterer entzündlicher, tumorigener Targets.	[101]
Interleukin-6 (IL-6)	Inflammatorisches Zytokin, welches NF-k β vermittelt zur Aktivierung von STAT3 führt. Dies bedingt vermehrte GBM Tumorigenität, durch Deregulation von Zellwachstum und Apoptosemechanismen.	[102,103]
Interleukin-8 (IL-8)	Mediator von NF-k β induzierter Tumorigenität im GBM.	[104]

Leukemia inhibitory factor (LIF)	Inflammatorisches Zytokin, fördert Tumorigenität und Tumorzellinvasion; Regulation von Gliom-induzierenden Zellen.	[105,106]
----------------------------------	--	-----------

Tabelle 15: Darstellung relevanter inflammatorischer Gene im GBM

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Analyse der oben genannten Gene benutzt, um die Funktion der miR-93 im GBM zu untersuchen. Um zu prüfen welchen Einfluss eine Stimulation durch Inflammediatoren auf die GBM-Zellreaktion hat, wurden U87 und T98G GBM-Zelllinien mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 β [101] oder mit Zellüberstand stimulierter PBMCs inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde aus den Zellen isoliert und die mRNA Expression nach reverser Transkription mittels qPCR evaluiert. Eine IL-1 β Konzentration von 10 ng/ml war dabei bereits ausreichend, um den stimulatorischen Effekt nachzuweisen. Abbildung 4 zeigt, dass die Stimulation mit 10 ng/ml von IL-1 β über 24 Stunden in U87 und T98G Zellen zu einer signifikanten Hochregulation der mRNA Expression von LIF, IL-1 β , COX2, IL-8, IL-6, CXCL5 und G-CSF führte. Auch die Stimulation von U87 Zellen mit Überstand stimulierter PBMCs zeigte eine deutliche Induktion der mRNA Expression von LIF, IL-1 β , COX2, IL-8, IL-6, CXCL5 und G-CSF.

Die Auswertung von U87 und T98G Zellüberständen mittels ELISA zeigte schließlich eine signifikant erhöhte Proteinsekretion von IL-6, IL-8 und CXCL5 nach IL-1 β Stimulation.

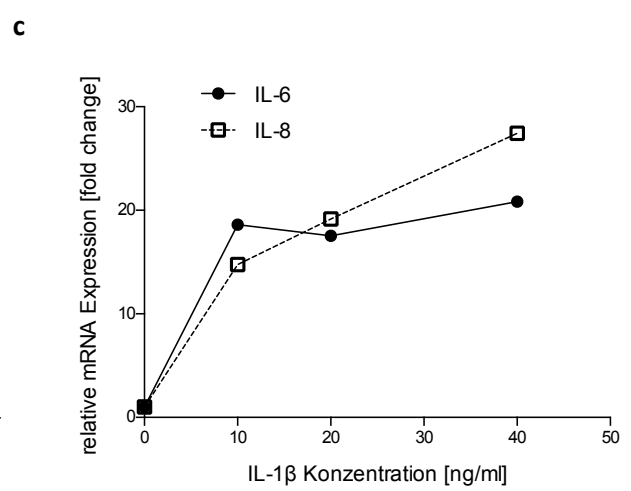
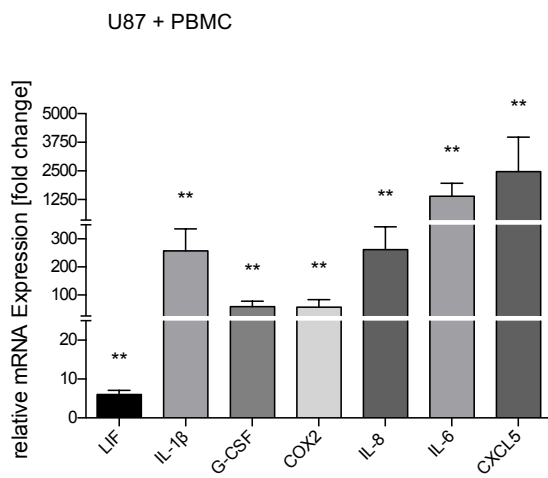
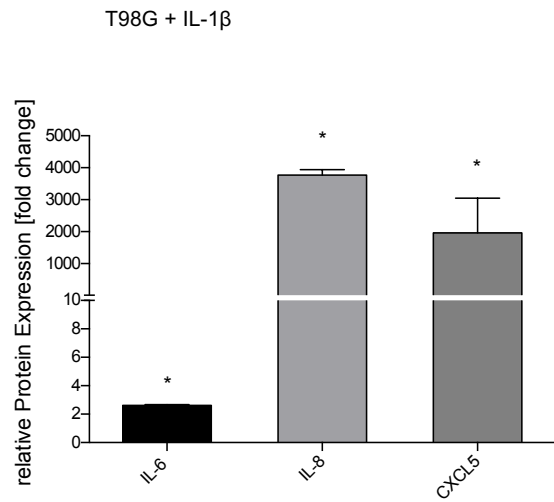
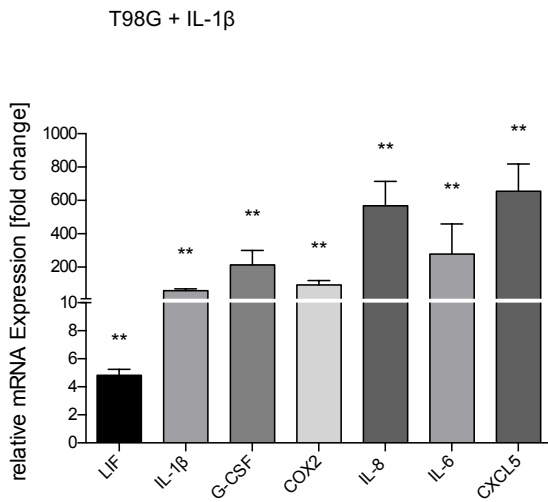
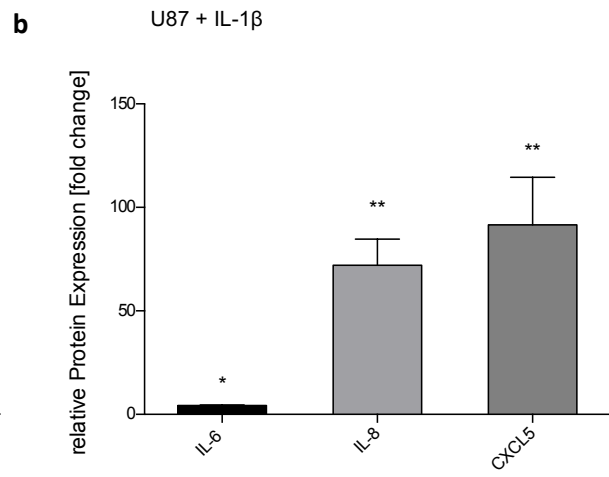
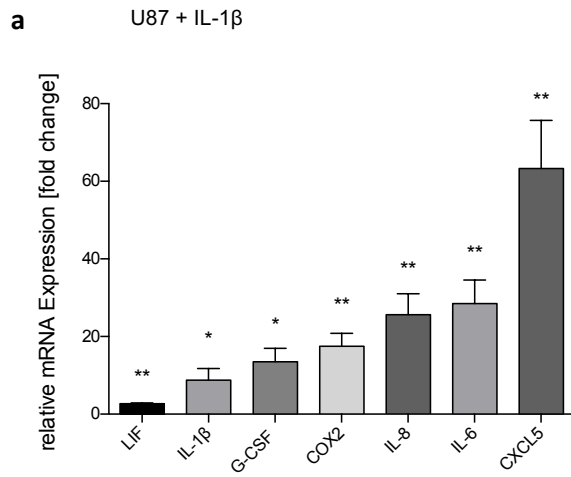


Abbildung 4: mRNA und Protein Expression inflammatorischer Gene nach Stimulation von GBM Zellen

- (a) Mittels qPCR bestimmte mRNA Expression [fold change] inflammatorischer Gene in GBM Zelllinien nach Stimulation mit IL-1 β bzw. mit Überstand von stimulierten PBMCs für 24 Stunden. **(oben)** U87 + IL-1 β : LIF: +2.7 \pm 0.2-fold; IL-1 β : +8.8 \pm 3.0-fold; G-CSF: +13.5 \pm 3.5-fold; COX2: +17.5 \pm 3.3-fold; IL-8: +25.6 \pm 5.4-fold; IL-6: +28.5 \pm 6.0-fold; CXCL5: +63.3 \pm 12.4-fold; n=3; **(mitte)** T98G + IL-1 β : LIF: +4.8 \pm 0.4-fold; IL-1 β : +58.6 \pm 10.7-fold; COX2: +92.8 \pm 27.2-fold; G-CSF: +212.8 \pm 87.3-fold; IL-6: + 278.2 \pm 181.3-fold; IL-8: +567.3 \pm 147.7-fold; CXCL5: +654.9 \pm 164.1-fold; n=5; **(unten)** mRNA U87 + PBMCs: LIF: +6.0 \pm 1.1-fold; COX2: +56.7 \pm 26.6-fold; G-CSF: +58.9 \pm 18.8-fold; IL-1 β : +257.2 \pm 78.4-fold; IL-8: +261.6 \pm 81.8-fold; IL-6: + 1393.7 \pm 572.5-fold; CXCL5: +2472.2 \pm 1501.1-fold; n=6. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; paired Student's t-test bzw. Wilcoxon-Signed Rank Test, *p < 0.05; **p < 0.01.
- (b) Mittels ELISA bestimmte Proteinexpression inflammatorischer Gene [fold change] nach IL-1 β Stimulation in Zellüberstand von U87 und T98G Zellen. **(oben)** U87 + IL-1 β : IL-6: +5.3 \pm 1.4-fold; IL-8: + 72.0 \pm 12.7-fold; CXCL5: + 91.5 \pm 23.1-fold; n=3; **(unten)** T98G + IL-1 β : IL-6: +2.1 \pm 0.05-fold; CXCL5: + 1959.1 \pm 1091.0-fold; IL-8: + 3770.2 \pm 174.2-fold; n=3. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; paired Student's t-test, *p < 0.05; **p < 0.01.
- (c) Mittels qPCR bestimmte mRNA Expression [fold change] der Targets IL-6 und IL-8 nach Stimulation mit unterschiedlichen IL-1 β Konzentrationen (n=1, Duplikate), nicht signifikant.
- (a-c) Die Werte entsprechen der Expression von stimulierten relativ zu unstimulierten Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass GBM-Zellen stark auf die inflammatorische Stimulation reagieren und nach Stimulation selbst aktiv Inflammationsmediatoren sezernieren.

Es wurde daher untersucht, ob die für miR-93 bekannten antiinflammatorischen Eigenschaften [85,87,90,91] auch in GBM Zellen das Zytokinexpressionsmuster beeinflussen.

5.2 MiR-93 wird in GBM-Biopsaten und Primärzelllinien vermindert exprimiert

Um einen ersten Hinweis auf die Rolle der miR-93 im GBM zu erhalten, erfolgte durch TaqMan® MicroRNA Assay eine vergleichende Quantifizierung der miR-93 Expression in Biopsaten von GBM Patienten (n=42), Normalhirngewebe (n=9), Primärzelllinien (n=8), U87 und T98G Zellen (n=6). Wie aus Abbildung 5 zu entnehmen ist, konnte im Vergleich zum Normalhirngewebe in GBM-Biopsaten und allen untersuchten GBM-Zelllinien eine signifikante Herunterregulation der miR-93 Expression gezeigt werden.

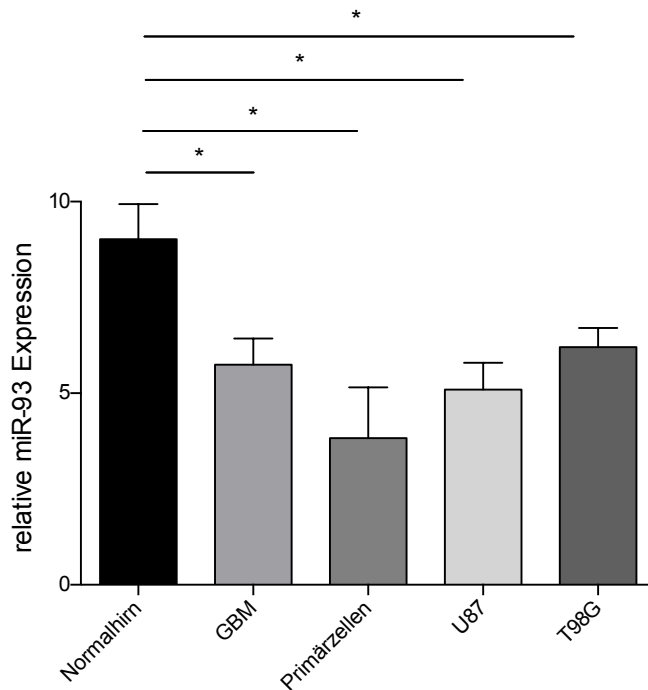


Abbildung 5: Relative miR-93 Expression in Normalhirngewebe, GBM-Biopsaten und GBM Zelllinien

- (a) Mittels TaqMan® MicroRNA Assay ermittelte normalisierte miR-93 Expression in GBM-Biopsaten (5.8 ± 0.7 ; $n=42$), primären GBM-Zelllinien (3.8 ± 1.3 ; $n=8$), U87- (5.1 ± 0.7 ; $n=6$) und T98 G-Zellen (6.2 ± 0.5 ; $n=6$) jeweils im Vergleich zu Normalhirngewebe (9.0 ± 0.9 ; $n=9$). Endogene Referenz: U47. Alle Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt; unpaired Student's t-test bzw. Mann-Whitney U-Test, * $p < 0.05$.

Dies ließ vermuten, dass die Immuno-miR-93 im GBM antiinflammatorisch wirkt und ihre Expression daher in in der Entstehung eines GBMs reduziert wird. Um dies zu prüfen wurde in den folgenden Experimenten eine Vorläufer-miR-93 in GBM-Zelllinien mittels transienter Transfektion re-exprimiert.

5.3 MiR-93 Re-Expression reprimiert die tumorinduzierte Zytokinsekretion in GBM Zelllinien

Mithilfe einer Microarray Genomanalyse wurden mRNA Expressionsprofile von miR-93/NC transfizierten und IL-1 β stimulierten U87 Zellen erstellt. Die Transfektionseffizienz wurde zuvor durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 6).

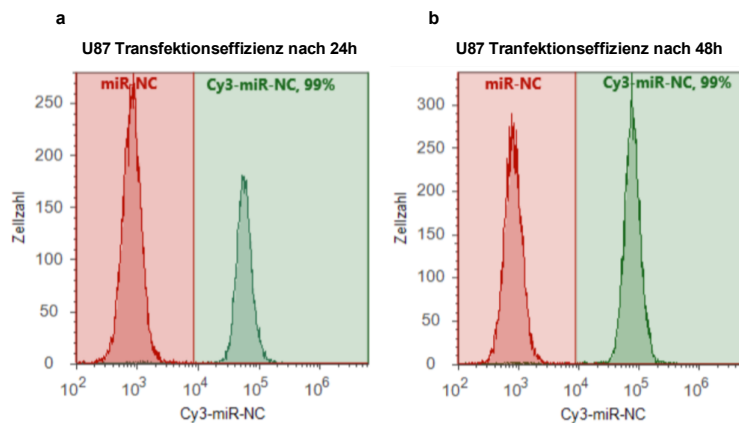


Abbildung 6: U87 Transfektionseffizienz nach 24 und 48 Stunden

Um den Anteil erfolgreich transfizierter U87 Zellen zu erfassen, wurden 2.5×10^5 U87 Zellen mit Cy3 dye labeled Pre-miRTM Negative Control (Cy3-miR-NC) transfiziert und die Fluoreszenz durchflusszytometrisch im Verhältnis zu Pre-miR-miRNA Precursor Negative Control #1 (miR-NC) transfizierten U87 Zellen bestimmt. Die Abbildung zeigt repräsentative Histogramme der Transfektionseffizienz zu verschiedenen Zeitpunkten (a) nach 24 h, (b) nach 48 h.

Die Ergebnisse des MicroArrays wurden bioinformatisch ausgewertet und zeigten die Regulation einer überproportional hohen Anzahl von Genen, die Schlüsselkomponenten inflammatorischer und hypoxischer Signalwege sind (siehe Abbildung 7). Dabei sind besonders der zentrale hypoxievermittelnde Transkriptionsfaktor HIF-1 α [70] und der Inflammationsmediator Map3K2 [107,108] hervorzuheben.

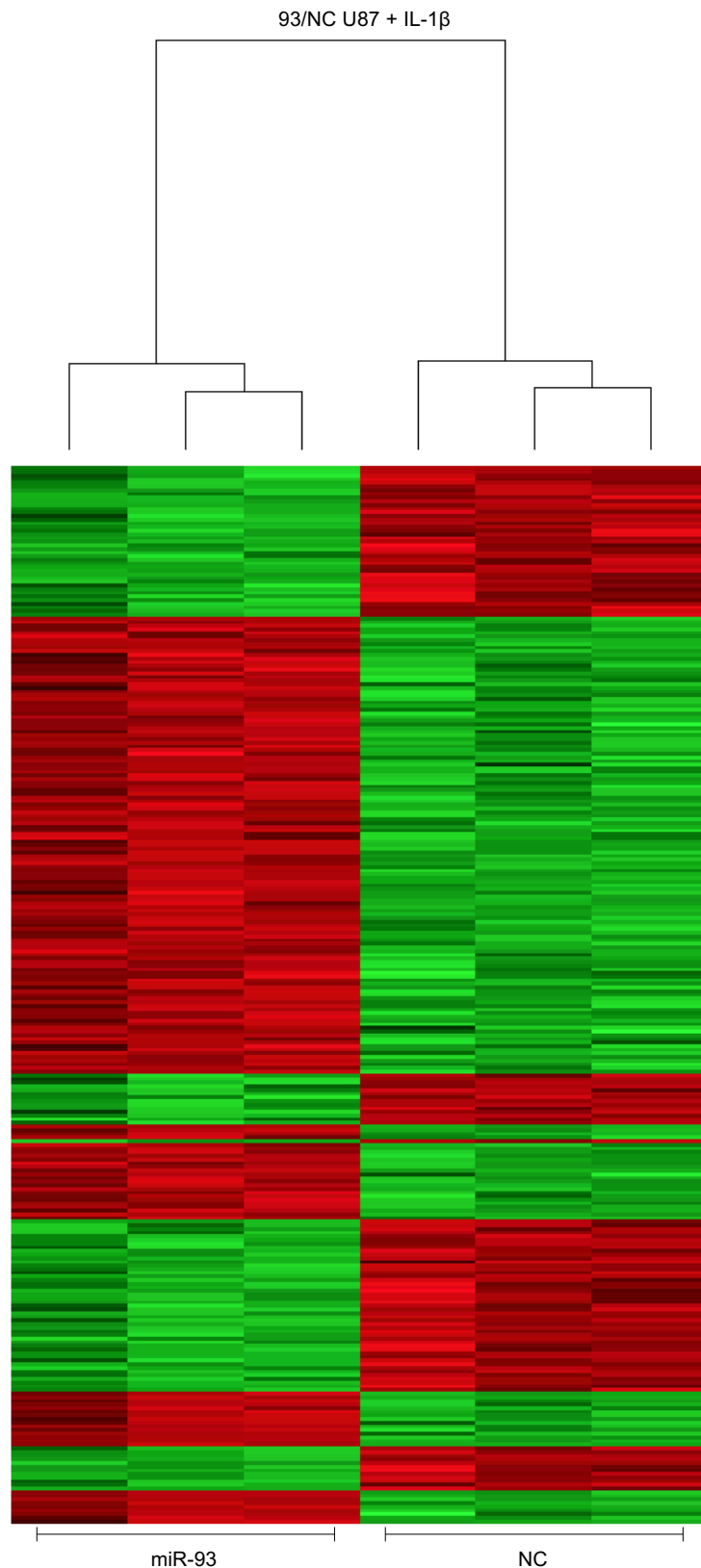


Abbildung 7: MicroArray Analyse von miR-93/ NC transfizierten und IL-1 β stimulierten U87 Zellen.

Dargestellt sind die differenziell regulierten Gene in IL-1 β stimulierten U87 Zellen nach Transfektion mit miR-93 bzw. Negativkontrolle (n=3). Grün: Induktion der mRNA Expression; Rot: Repression der mRNA Expression. Microarray Daten abrufbar unter ArrayExpress (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>, accession number E-MTAB-8395).

Mittels qPCR konnten die Ergebnisse für Map3K2, HIF-1 α und die in Tabelle 15 genannten Gene validiert werden. Besonders hervorzuheben ist, dass die transiente miR-93 Transfektion in inflammatorisch stimulierten U87 GBM Zellen auch zu einer signifikanten Herunterregulation der mRNA Expression von IL-6, G-CSF, IL-8, COX2, IL-1 β , CXCL5, LIF führte (Abbildung 8). Die inflammatorische Stimulation in unbehandelten Zellen hatte zu einer starken Induktion dieser Gene geführt (Abbildung 4).

Ein selektiver Einfluss der Ergebnisse durch IL-1 β Stimulation wurde ausgeschlossen, indem miR-93/NC transfizierte U87 Zellen mit dem Überstand stimulierter PBMCs inkubiert wurden. Auch hier zeigte sich eine deutliche Reduktion der IL-6, G-CSF, IL-8, COX2, IL-1 β , CXCL5, LIF, Map3K2 und HIF-1 α mRNA Expression. Letztlich konnten die Versuche auch in mit IL-1 β stimulierten GBM Primärzellen, isoliert aus chirurgisch resezierten Tumoren, wiederholt werden. Bis auf COX-2 konnte in Primärzellen eine signifikante Herunterregulation der mRNA Expression oben genannter Mediatoren reproduziert werden.

Die hier gezeigten transkriptionellen Regulationsmechanismen wurden schließlich auf Proteinebene bestätigt. Der dazu durchgeführte Multiplex Protein Assay aus U87 Zellüberständen zeigte eine deutliche Reduktion der IL-1 β getriggerten IL-6, IL-8, CXCL5, LIF und G-CSF Sekretion nach miR-93 Transfektion.

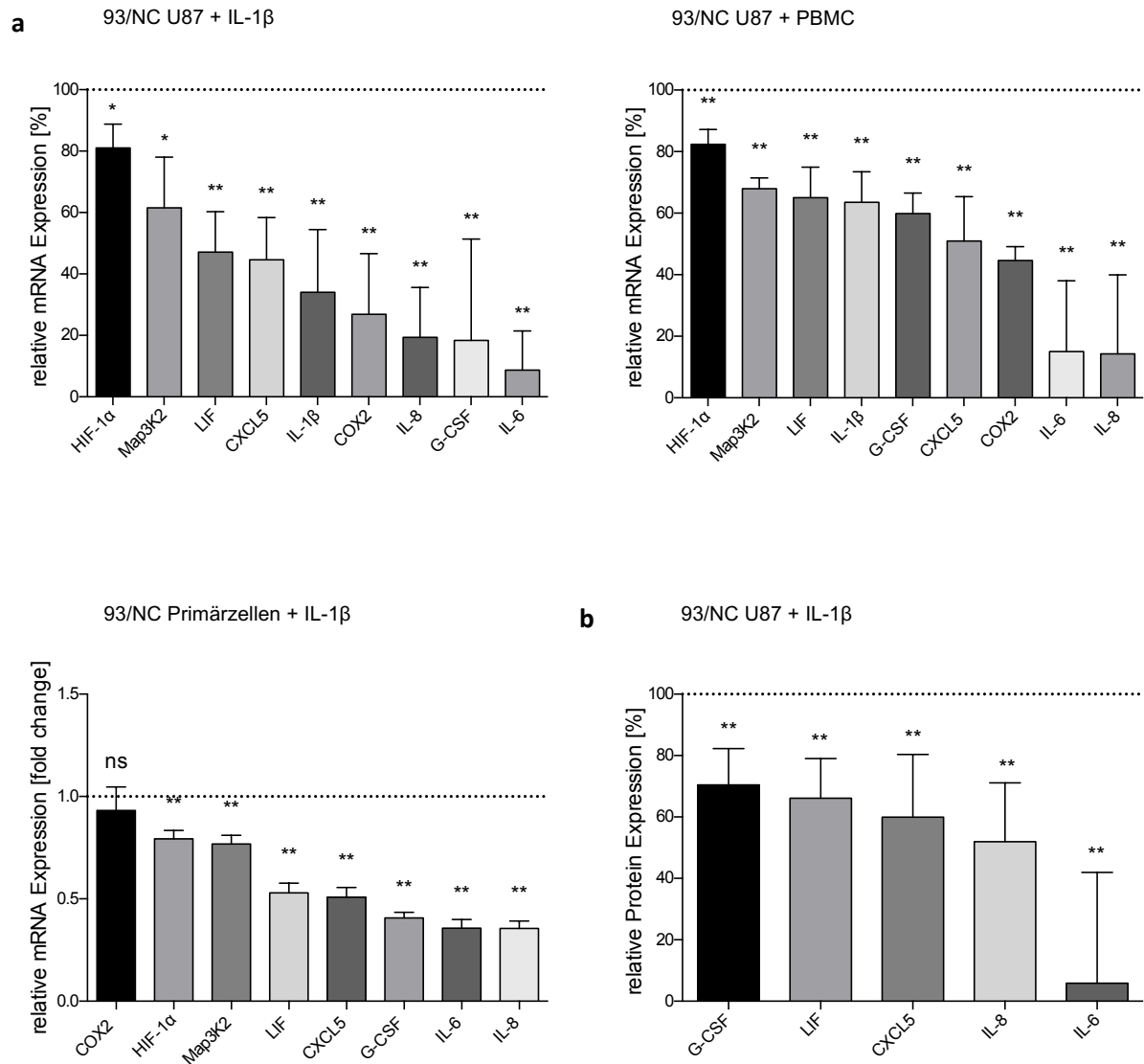


Abbildung 8: miR-93 Transfektion reduziert inflammatorische Genexpression und Zytokinsekretion in GBM Zelllinien

- (a) Mittels qPCR bestimmte relative mRNA Expression [%] inflammatorischer Gene in GBM Zellen, die mit IL-1 β bzw. mit dem Überstand stimulierter PBMCs stimuliert und mit miR-93 bzw. Negativkontrolle (gestrichelte Linie) transient transfiziert wurden. **(oben links)** 93/NC U87 + IL-1 β : IL6:-91.3% \pm 12.8%; G-CSF:-81.6% \pm 33.0%; IL8:-80.7% \pm 16.3%; COX2:-73.1% \pm 19.8%; IL-1 β :-66.0% \pm 20.5%; CXCL5:-55.3% \pm 13.7%; LIF:-52.9% \pm 13.2%; Map3K2:-38.5% \pm 16.5%; HIF-1 α :-19.0% \pm 7.8%; n=5; **(oben rechts)** 93/NC U87 + PBMC: IL8:-85.7% \pm 25.6%; IL6:-85.0% \pm 23.0%; COX2:-55.3% \pm 4.4%; CXCL5:-49.0% \pm 14.4%; G-CSF:-40.1% \pm 6.6%; IL-1 β :-36.5.0% \pm 10.0%; LIF:-34.9% \pm 9.9%; Map3K2:-32.0% \pm 3.4%; HIF-1 α :-17.6% \pm 4.9%; n=3; **(unten links)** 93/NC Primärzellen + IL-1 β : IL-8:-64.4% \pm 3.6%; IL-6:-64.3% \pm 4.2%; G-CSF:-59.3.8% \pm 2.7%; CXCL5:-49.2% \pm 4.8%; LIF:-47.0% \pm 4.8%; Map3K2: -23.2% \pm 4.2%; HIF-1 α :-20.7% \pm 4.2%; COX2:- 6.8% \pm 11.5%; n=7. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; paired Student's t-test bzw. Wilcoxon-Signed Rank Test, ns= nicht signifikant; *p < 0.05; **p < 0.01.
- (b) Mittels Multiplex Protein Assay bestimmte Protein Expression [%] inflammatorischer Gene in den Überständen von IL-1 β stimulierten, miR-93/NC transfizierten U87 Zellen: IL6:-94.1% \pm 36.0%; IL8:-

48.1%±19.2%; CXCL5:-40.0%±20.4%; LIF:-33.9%±12.9% G-CSF:-29.5%±11.8%; n=5. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; paired Student's t-test; **p < 0.01.

(a+b) Die Werte entsprechen der Expression relativ zur Transfektions-Negativkontrolle.

Aus aktuellen Studien geht hervor, dass die Progression des GBMs sowohl durch Inflammation als auch durch Hypoxie verstärkt wird. Das Ko-Existieren beider Signalwege führt zu einer Multiplikation der jeweiligen Effekte auf die Tumorzelle [46,68,109]. Um den Einfluss der miR-93 auf GBM-Tumorzellen unter hypoxischen und inflammatorischen Bedingungen zu untersuchen, wurden miR-93/NC transfizierte U87 Zellen mit IL-1 β stimuliert und gleichzeitig bei 5% O₂ hypoxisch inkubiert. Abbildung 9 zeigt, dass die transiente Transfektion von miR-93 im Vergleich zur Negativkontrolle auch unter diesem maximalen inflammatorischen Stress zu einer signifikanten Verringerung der mRNA-Expression von IL-6, IL-8, IL-1 β , LIF, G-CSF, COX2, CXCL5, Map3K2 und HIF-1 α führte. Letztlich konnte durch Western-Blot-Analysen für Map3K2 und HIF-1 α auch eine reduzierte Proteinexpression nachgewiesen werden.

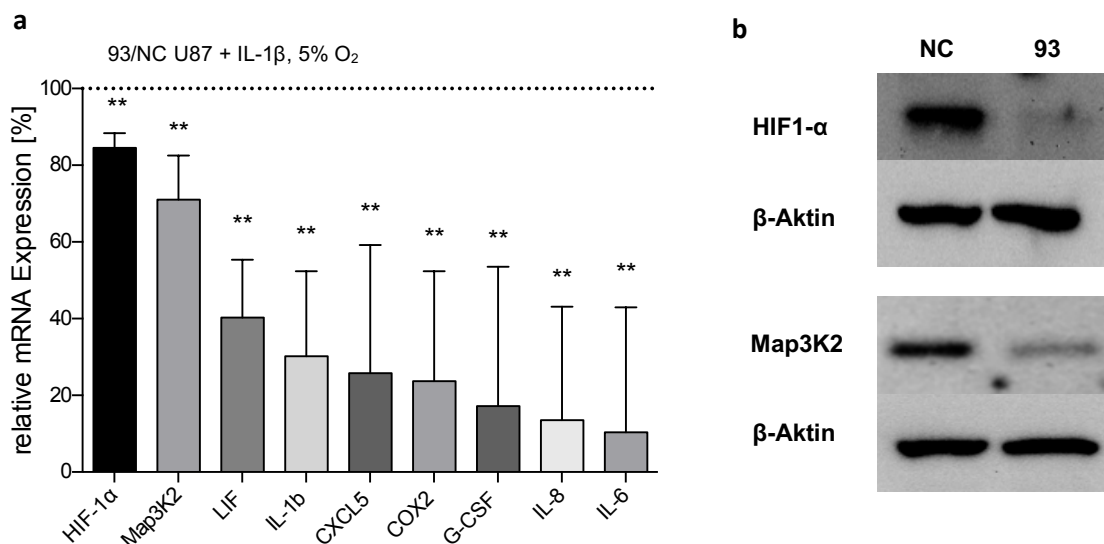


Abbildung 9: miR-93 Transfektion reduziert inflammatorische Genexpression auch bei maximaler inflammatorischer Stimulation durch Hypoxie und IL-1 β

- (a) Mittels qPCR bestimmte relative mRNA Expression [%] von inflammatorischen Genen in U87 Zellen, die mit miR-93 bzw. Negativkontrolle (gestrichelte Linie) transient transfiziert, für 24 Stunden in 5% O₂ inkubiert und mit IL-1 β stimuliert wurden. Die Werte entsprechen der Expression relativ zur Transfektions-Negativkontrolle. IL-6:-89.6%±32.5%; IL-8:-86.4%±29.5%; G-CSF:-82.8%±36.3%; COX2:-76.3%±28.6%; CXCL5:-74.2%±33.4%; IL-1 β :-69.8%±22.2%; LIF:-59.7%±15.0%; Map3K2: -29.0%±11.5%; HIF-1 α :-15.4%±3.8%; n=4. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; paired Student's t-test, **p < 0.01.
- (b) HIF-1 α und Map3K2 Proteinexpression in IL-1 β stimulierten und bei in 5% O₂ inkubierten U87 Zellen nach Transfektion mit miR-93 bzw. miR-NC. Gesamtprotein wurde extrahiert und eine Western Blot Analyse durchgeführt. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Abbildung aus n=3 Einzelversuchen.

Zusammengefasst zeigen die erhobenen Daten, dass die miR-93 in maximal inflammatorisch stimulierten GBM-Zellen die Expression und Sekretion tumorigener Zytokine signifikant abschwächt und einen antiinflammatorischen Phänotyp erzeugt. Insbesondere werden auch Schlüsselgene inflammatorischer und hypoxischer Signalwege, wie Map3K2 und HIF-1 α , reprimiert.

5.4 Experimentelle Validierung potentieller miR-93 Zielgene identifiziert LIF, IL-6, G-CSF, Map3K2 und HIF-1 α als neue miR-93 Targets

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob der antiinflammatorische Zellphänotyp nach miR-93 Transfektion auf direkte oder indirekte Regulationsmechanismen zurückzuführen ist. Von den oben genannten regulierten Genen war nur IL-8 als direktes miR-93 Zielgen bekannt [85]. Zunächst wurden die microRNA-Datenbanken TargetScanHuman 6.2 und PITA verwendet, die durch computergestützte Algorithmen potentielle miRNA-mRNA Interaktionen vorhersagen können. Dabei konnten miR-93 Bindestellen in den 3'UTRs von LIF, HIF-1 α , Map3K2 und CXCL5 identifiziert werden. Für G-CSF, IL-6 und COX2 wurde keine direkte Regulation durch die Algorithmen vorhergesagt. Die *in silico* Zielgen Analyse basiert dabei auf der Vorhersage kanonischer Bindestellen, welche durch eine vollständig komplementäre Basenpaarung zwischen der Seed-Sequenz im 5'-Bereich der miRNA und dem 3'UTR der mRNA gekennzeichnet ist. Neben der kanonischen miRNA-mRNA Interaktion ist allerdings auch eine Regulation über nicht-kanonische Bindestellen möglich. Diese werden durch die Vorhersage-Algorithmen nicht erkannt [110-112].

Um sowohl kanonische als auch nicht-kanonische Bindestellen experimentell zu validieren, wurde ein dualer Luciferase-Reporter-Gen-Assay eingesetzt. Dazu wurden die 3'UTR Sequenzen sämtlicher regulierter Gene (COX2, CXCL5, LIF, IL-6, G-CSF, Map3K2 und HIF-1 α) jeweils in die Multiple Cloning Site des psiCHECKTM-2 Vektors am 3' Ende des *Renilla* Luciferase Gens kloniert und durch Sequenzierung verifiziert.

Nach Kotransfektion von HEK-293/ bzw. U87 Zellen mit miR-93/NC und dem jeweiligen Luciferase Reporter Vektor Konstrukt wurde luminometrisch ermittelt, ob die miR-93 direkt mit dem 3'UTR des Zielgens interagiert. Die direkte RNA Interferenz konnte durch Abnahme der *Renilla* Luciferase Aktivität nachgewiesen werden.

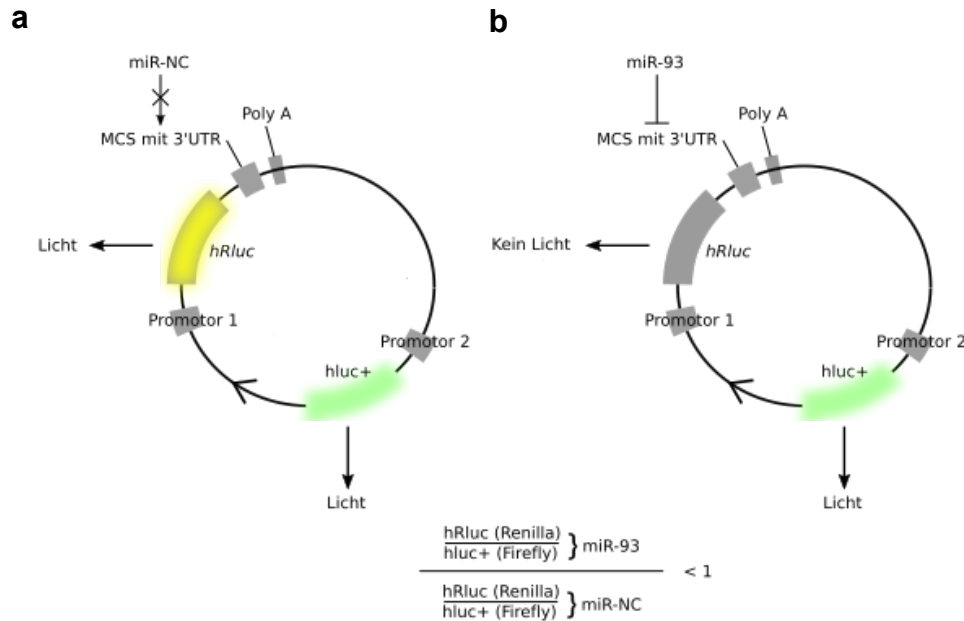


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Dual Luciferase Assays

(a und b) Schematische Darstellung des Dual Luciferase Assays: Das Vektorkonstrukt mit der enthaltenen 3'UTR Sequenz wurde mit miR-NC (a) bzw. miR-93 (b) in HEK-293/ U87 kotransfiziert. Transfektion mit NC führt zu keiner Einschränkung der Firefly (hLuc+) oder Renilla (hRluc) Luciferase Aktivität. Transfektion mit miR-93 führt bei erfolgreicher Bindung im Bereich des 3'UTRs zum Abbau der mRNA und zur Verminderung der hRluc. Der hRluc/hLuc+ Quotient wird auf NC normalisiert. Eine Ratio < 1 spricht für eine direkte miR-mRNA Interaktion.

Durch die Bestimmung der jeweiligen Luciferaseaktivität wurden LIF, G-CSF, IL-6, Map3K2 und HIF-1 α erstmalig als direkte miR-93 Zielgene identifiziert (siehe Abbildung 11). Es zeigte sich hingegen keine direkte miR-93 Regulation von COX2 und CXCL5. Es war jedoch davon auszugehen, dass es bei miR-93 Transfektion zu einer indirekten Regulation von COX2 und CXCL5 kommt, die durch direkte Inhibition eines COX2 und CXCL5 induzierenden Zielgens bedingt wird.

5.5 Doppelknockdown von HIF-1 α und Map3K2 führt zur Herunterregulation von COX2 und CXCL5

Sowohl Inflammation als auch Hypoxie verursachen eine Induktion von COX2 und CXCL5 [113-116]. Map3K2 und HIF-1 α sind zentrale Induktoren inflammatorischer und hypoxischer Signalkaskaden. [108,113,117-119]

Nachdem beide Gene in dieser Arbeit erstmalig als direkte miR-93 Targets beschrieben wurden, stellte sich die Frage, ob die direkte Regulation von Map3K2 und HIF-1 α durch miR-93 eine indirekte Regulation von COX2 und CXCL5 nach sich zieht.

Aus diesem Grund wurde ein Doppelknockdown von Map3K2 und HIF-1 α durch genspezifische siRNA durchgeführt. Abbildung 11 zeigt, dass der Knock-Down dieser beiden Gene in IL-1 β stimulierten und 5% O₂ hypoxisch inkubierten U87 Zellen tatsächlich zu einer signifikanten Repression der COX2 und CXCL5 mRNA Expression führte. Die Knockdowneffizienz von Map3K2 und HIF-1 α war adäquat.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass der simultane Knock-Down von Map3K2 und HIF-1 α Änderungen in der Expression von COX2 und CXCL5, ähnlich dem durch die miR-93 Überexpression erzeugten Phänotypen, verursacht.

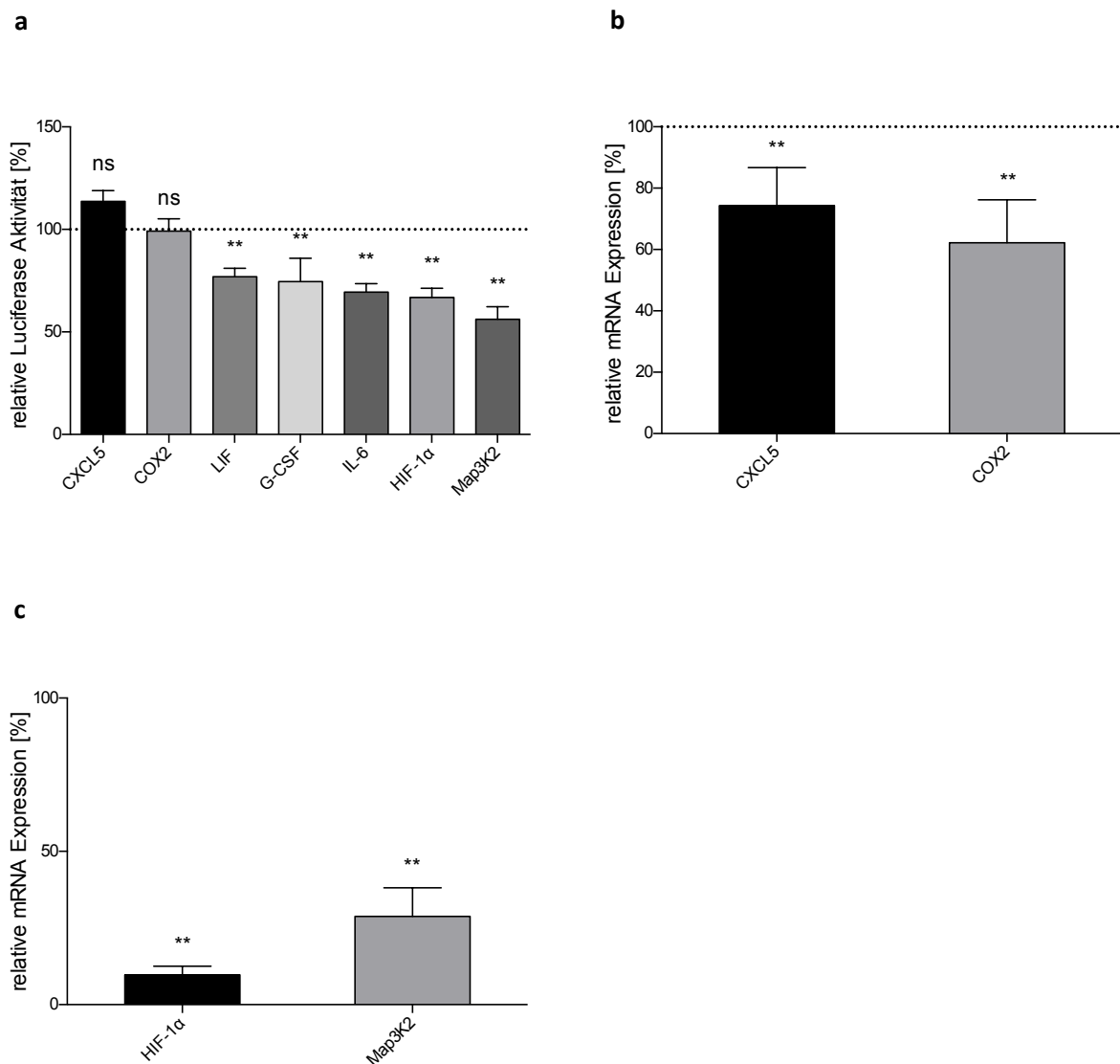


Abbildung 11: Target Validierung identifiziert LIF, G-CSF, IL-6, Map3K2 und HIF-1 α erstmalig als direkte miR-93 Zielgene; Herunterregulation von COX2 und CXCL5 vermittelt durch die direkten Zielgene HIF-1 α und Map3K2

(a) Relative Luciferase Aktivität [%] nach transientser Koftransfektion von miR-93 bzw. NC und dem entsprechend kloniertem psiCHECKTM-2 Dual-Luciferase Vektor Konstrukt. Die Werte entsprechen RenillaLuciferase/FireflyLuciferase Expression relativ zur Transfektions-Negativkontrolle. Map3K2: -43.9% \pm 6.2%; HIF-1 α : -33.2% \pm 4.5%; IL-6:-30.5% \pm 4.0%; G-CSF:-25.5% \pm 11.4%; LIF:-23.2% \pm 4.2%;

COX2:-0.8%±6.0%; CXCL5:+13.7%±5.2%; COX2/CXCL5 n=3, LIF n=4, G-CSF/IL-6 n=5, HIF-1α n=9, Map3K2 n=11; G-CSF und IL-6 in U87, alle anderen Targets in HEK-293. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; paired Student's t-test bzw. Wilcoxon-Signed Rank Test, ns= nicht signifikant; **p < 0.01.

(b) Mittels qPCR bestimmte relative mRNA Expression [%] von COX2 und CXCL5 nach Doppelknockdown von Map3K2 und HIF-1α durch spezifische siRNA in U87 Zellen, die für 24h in 5 % O₂ inkubiert und mit IL-1β stimuliert wurden. Die Werte entsprechen der Expression relativ zur Transfektions-Negativkontrolle; COX2:-37.8%±14.0%; CXCL5:-25,7%±12.4%; n=8. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; paired Student's t-test, **p < 0.01.

(c) Bestimmung der Knockdowneffizienz von Map3K2 und HIF-1α nach Transfektion spezifischer siRNA. Die Werte entsprechen der Expression relativ zur Transfektions-Negativkontrolle; HIF-1α:-90.3%±2.8%; Map3K2 -71.2%±9.4%; n=8. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; paired Student's t-test, **p < 0.01.

5.6 Der regulatorische Effekt der miR-93 beruht auf der Interaktion mit zwei Bindestellen im Map3K2 3'UTR

Da die miR-93 Regulation von Map3K2 und HIF-1α so weitreichende Konsequenzen auf den Zellphänotyp nach miR-93 Re-Expression hatte, folgte für diese beiden Gene eine detaillierte Analyse der miR-93 Bindestellen im jeweiligen 3'UTR. Mithilfe von TargetScanHuman 6.2, konnten zwei putative miR-93 Bindestellen im 3'UTR von Map3K2 identifiziert werden (Abbildung 12).

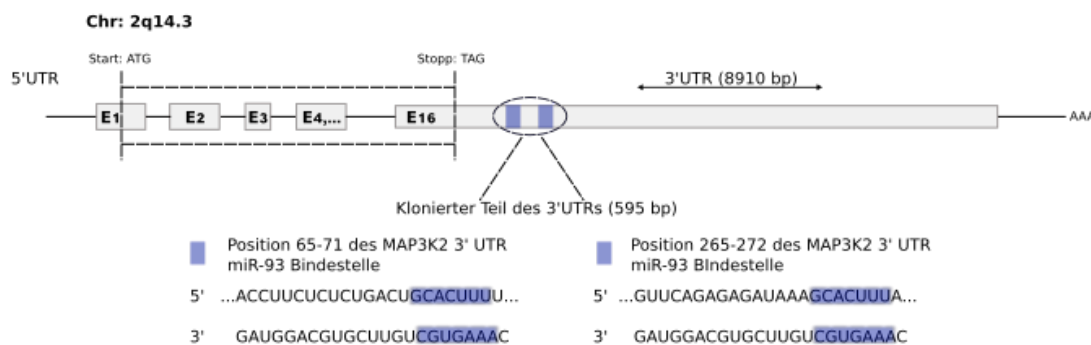


Abbildung 12: miR-93 Bindestellen im Map3K2 3'UTR

Schematische Darstellung des Map3K2 Gens (NM_006609.4). Das Zielgen befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 2 (Chr: 2q14.3) und enthält die miR-93 Bindestellen an den Positionen 65-71 und 265-272 des 3'UTRs. Die Target Sequenz lautet 5'GCACUUU3'.

Der 3'UTR ist 8910 bp lang, in den psiCHECKTM-2 Vektor wurde davon der markierte Bereich von 595 bp kloniert. Insgesamt enthält der 3'UTR mehr als die in der Abbildung markierten potenziellen miR-93

Bindestellen. Dargestellt sind hier nur die Bindestellen, welche in den psiCHECK™-2 kloniert wurden. Die anderen Target Sites hingegen wiesen nach Auswertung mithilfe der microRNA-Datenbanken TargetScanHuman 6.2 und PITA eine zu niedrige Bindungswahrscheinlichkeit auf, die sich durch einen zu hohen Context Score äußerte [120].

Um den regulativen Einfluss dieser Bindestellen auf die mRNA Expression von Map3K2 zu untersuchen, wurden diese sequentiell mutiert und die Vektorkonstrukte anschließend zusammen mit der miR-93 bzw. antimiR-93 (anti-93) als Negativ-Kontrolle in HEK-293 Zellen kotransfiziert.

Map3K2 Wildtyp 3'UTR (WT) Psi seq -17..957 of sequence

TCCCTACACCCGAGTTCGTGAAGGTGAAGGGCCTCCACTTCAGCCAGGAGGACGCTCCAGA
 TGAATGGGTAAGTACATCAAGAGCTTCGTGGAGCGCGTGCTGAAGAACGAGCAGTAATT
 CTAGGCGATCGCTCGAGGCTGATGAACCTCTAAGGCACATGTTTGTGCATTATCACTAGC
 AGCCAGTAACCTCTCCTGTGCCTCTACCTAGCTCCCATCTATTCACTACCTTCTCTCTG
 ACTGCACTTTCTTTTTTATAAAAAAGAGAGATGGGGGAGAAAAAGACAAGAGGGAAA
 GTATTTCTCTTATTCTGGTTAAATTTGTTTAAATAATAATAATATCCTAAATTTTTAT
 ATTTAATCTTTTTTCCCTTACAAGAACTTGAAGTTTTTTTTTTAATTTTTATAATGTA
 CTGATGTGGTTCAGAGAGATAAAGCACTTGTAGTACATAGTCACTCTTTTAGTACAAACA
 AATCATTTGGAATACCTAAAGATTGTAGAGTCATCCCTCTATCACTGACACATCAGTGA
 CGATGGGAAGACATGGAAAACAAGGAGAAGAAAATGATGTATAATTTGTAGTTTTAGTG
 ATAGTATTTAAAATATATCCTCATTGTGGGGTTGAGCCCTAAACTTTAGTTTAGGGTAG
 GTACTCAACTTAAAGAATATAGGTTTCTTCTTATATCTGTATTCTTTAGATCCTAACCTC
 TGTCTACCAACCSCGGCCGCTGGCCGCAATAAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGT
 GTTGGTTTTTTGTGTGAGGATCTAAATGAGTCTTCGGACCTCGCGGGGGCCGCTTAAGCGG
 GTGGTTAGGGTTTGTCTGACCGGGGGAGGGGAAGGAACGAAACACTCTCATTCCGGAG
 CGGCTCGGGGTTTGGTCTTGGTGGCCACGGGCACGCAGAA

Map3K2 Mutation der Bindestelle 1 (BS1) Psi seq - 18..959 of sequence

CTAACCCCGAGTTCGTGAAGGTGAAGGGCCTCCACTTCAGCCAGGAGGACGCTCCAGATG
 AAATGGGTAAGTACATCAAGAGCTTCGTGGAGCGCGTGCTGAAGAACGAGCAGTAATTCT
 AGGCGATCGCTCGAGGCTGATGAACCTCTAAGGCACATGTTTGTGCATTATCACTAGCAG
 CCAGTAACCTCTCCTGTGCCTCTACCTAGCTCCCATCTATTCACTACCTTCTCTCTGAC
 TSCGTTTTCTTTTTTATAAAAAAGAGAGATGGGGGAGAAAAAGACAAGAGGGAAAAGT
 ATTTCTCTTATTCTGGTTAAATTTGTTTAAATAATAATAATATCCTAAATTTTTATAT
 TTAATCTTTTTTCCCTTACAAGAACTTGAAGTTTTTTTTTTTTAATTTTTATAATGTAC
 TGATGTGGTTCAGAGAGATAAAGCACTTGTAGTACATAGTCACTCTTTTAGTACAAACAA
 ATCATTGGAATACCTAAAGATTGTAGAGTCATCCCTCTATCACTGACACATCAGTGA
 GATGGGAAGACATGGAAAACAAGGAGAAGAAAATGATGTATAATTTGTAGTTTTAGTGA
 TAGTATTTAAAATATATCCTCATTGTGGGGTTGAGCCCTAAACTTTAGTTTAGGGTAGG
 TACTCAACTTAAAGAATATAGGTTTCTTCTTATATCTGTATTCTTTAGATCCTAACCTCT
 GTCTACCAACCSCGGCCGCTGGCCGCAATAAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTG
 TTGGTTTTTTGTGTGAGGATCTAAATGAGTCTTCGGACCTCGCGGGGGCCGCTTAAGCGG
 TGGTTAGGGTTTGTCTGACCGGGGGAGGGGAAGGAACGAAACACTCTCATTCCGGAGG
 CGGCTCGGGGTTTGGTCTTGGTGGCCACGGGCACGCAGAA

Map3K2 Mutation der Bindestelle 2 (BS2) Psi seq - 16..945 of sequence

TTCCTAACCCGAGTTCGTGAAGGTGAAGGGCCTCCACTTCAGCCAGGAGGACGCTCCAG
 GATGAAATGGGTAAGTACATCAAGAGCTTCGTGGAGCGCGTGCTGAAGAACGAGCAGTAAT
 TTCTAGGCGATCGCTCGAGGCTGATGAACCTCTAAGGCACATGTTTGTGCATTATCACTA
 GCAGCCAGTAACCTCTCCTGTGCCTCTACCTAGCTCCCATCTATTCACTACCTTCTCTC
 TGACTGCACTTTCTTTTTTATAAAAAAGAGAGATGGGGGAGAAAAAGACAAGAGGGGA
 AAGTATTTCTCTTATTCTGGTTAAATTTGTTTAAATAATAATAATATCCTAAATTTTTT
 ATATTTAATCTTTTTTCCCTTACAAGAACTTGAAGTTTTTTTTTTAATTTTTATAATG
 TACTGATGTGGTTCAGAGAGATAAAGCGTTTGTAGTACATAGTCACTCTTTTTCATGCGTT
 TGCGTTGCTCGGGGTCGTACACCTTGGGAAGCCATGGTGGCTAGCCTATAGTGAGTCTGAT
 TAAGTACTCTAGCCTTAAGAGCTGTAATGAACTGGGAGTGGACACCTGTGGAGAGAAAG
 GCAAAGTGGATGTCAGTAAGACCAATAGTGCCTATCAGAAACGCAAGAGTCTTCTCTGT
 CTCGACAAGCCAGTTTCTATTGGTCTCCTTAAACCTGTCTTGAACCTTGATACTTACC
 TGCCCAAGTGCCTCAGCAACCTTCTGCAGCTTAAGTTCGAGACTGTTGTGTGAGAAGAA
 TCAAGTTTTTGCAAAAGCCTAGGCCTCCAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGC
 TCAGAGTCCGAGSCGGCCGCTGGCCCTCTGCATAAATAAAAAAATAGTCAAGCCATGGGG
 CGGAGAATGGCGGAACCTGGCCGGAATTA

Map3K2 Vollmutante Psi seq - 23..917 of sequence

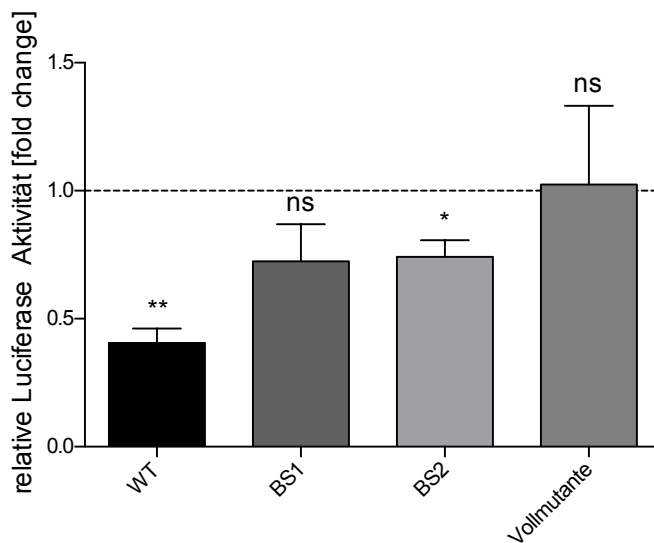
TAACACCGAGTTCGTGAAGGTGAAGGGCCTCCACTTCAGCCAGGAGGACGCTCCAGATGA
 AATGGGTAAGTACATCAAGAGCTTCGTGGAGCGCGTGCTGAAGAACGAGCAGTAATTCTA
 GCGGATCGCTCGAGGCTGATGAACCTCTAAGGCACATGTTTGTGCATTATCACTAGCAGC
 CAGTAACCTCTCCTGTGCCTCTACCTAGCTCCCATCTATTCACTACCTTCTCTCTGACT
 SCGTTTTCTTTTTTATAAAAAAGAGAGATGGGGGAGAAAAAGACAAGAGGGAAAAGTA
 TTTCTCTTATTCTGGTTAAATTTGTTTAAATAATAATAATATCCTAAATTTTTATAT
 TAATCTTTTTTCCCTTACAAGAACTTGAAGTTTTTTTTTTTTAATTTTTATAATGTACT
 GATGTGGTTCAGAGAGATAAAGCGTTTGTAGTACATAGTCACTCTTTTAGTACAAACAA
 TCATTTGGAATACCTAAAGATTGTAGAGTCATCCCTCTATCACTGACACATCAGTGAAG
 ATGGGAAGACATGGAAAACAAGGAGAAGAAAATGATGTATAATTTGTAGTTTTAGTGA
 AGTATTTAAAATATATCCTCATTGTGGGGTTGAGCCCTAAACTTTAGTTTAGGGTAGGT
 ACTCAACTTAAAGAATATAGGTTTCTTCTTATATCTGTATTCTTTAGATCCTAACCTCTG
 TCTACCAACCSCGGCCGCTGGCCGCAATAAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGT
 TGGTTTTTTGTGTGAGGATCTAAATGAGTCTTCGGACCTCGCGGGGGCCGCTTAAGCGGT
 GTTTAGGGTTTGTCTGACCGGGGGAGGGGAAGGAACGAAACACTCTCATTCCG

Abbildung 13: DNA Sequenzierungsanalyse der Map3K2 3'UTR Mutagenese

Beispielhafte DNA-Sequenzanalyse (Eurofins MWG Operon) der sequentiellen Mutagenese der miR-93 Bindestellen im 3'UTR von Map3K2.

5'CTCGAG3': XhoI Forward, 5'GCGGCCGC3': NotI-HF, 5'GCACTTT3': miR-93 Bindestelle, 5'GCGTTTT3': mutierte miR-93 Bindestelle, grau: psiCHECK™-2 Vektor

Die folgende luminometrische Bestimmung der Luciferase Aktivität zeigte im Vergleich zu der Negativ-Kontrolle einen durch die jeweiligen Bindestellen additiven Regulationseffekt und signifikante Verminderung der Luciferase Aktivität. Nach Mutation beider Bindestellen konnte der regulatorische Effekt aufgehoben werden. Die Wildtyp Transfektion des Map3K2 3'UTRs führte zu einer Verminderung der relativen Luciferase Aktivität auf das 0.40 ± 0.03 -fache. Nach Mutation der miR-93 Bindestelle 1 erhöhte sich die relative Luciferase Aktivität auf das 0.74 ± 0.13 -fache und nach Mutation der Bindestelle 2 auf $0.74 \pm 0,04$ -fache. Nach Deletion beider Bindestellen in der Vollmutante war die Regulation aufgehoben (1.01 ± 0.15 -fach).

**Abbildung 14: Sequentielle Mutagenese des Map3K2 3'UTRs in HEK293**

- (a) Relative Luciferase Aktivität des Map3K2 Vektorkonstrukts nach Kotransfektion des Wildtyp (WT) bzw. mutierten Plasmids (BS1, BS2, Vollmutante) und miR-93/anti-93; n=3. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; paired Student's t-test, ns= nicht signifikant; *p < 0.05; **p < 0.01.

Zu erkennen ist der jeweilige regulatorische Effekt der beiden putativen Bindestellen und die additive Wirkung der Deletion beider Bindestellen in der Vollmutante. Die Werte entsprechen RenillaLuciferase/FireflyLuciferase Expression relativ zur Transfektions-Negativkontrolle.

5.7 Der regulatorische Effekt der miR-93 beruht auf der Interaktion mit einer Bindestelle im HIF-1 α 3'UTR

Oben genanntes Vorgehen wurde auch zur Untersuchung der Bindestellen von miR-93 im 3'UTR von HIF-1 α durchgeführt. Mithilfe von TargetScanHuman 6.2, konnte eine putative miR-93 Bindestelle identifiziert werden.

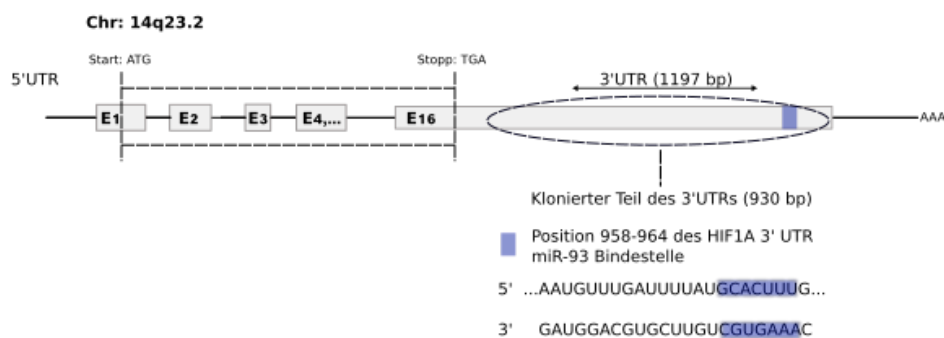


Abbildung 15: miR-93 Bindestelle im HIF-1 α 3'UTR

Schematische Darstellung des HIF-1 α Gens (NM_001530.3, Transcript Variant (1), predominant transcript)

Der 3'UTR ist 1197bp lang, kloniert wurde davon der markierte Bereich von 930 bp.

Das Zielgen befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 14 (Chr: 14q23.2) und enthält die miR-93 Bindestelle auf Position 958-964 des 3'UTRs. Die Target Sequenz lautet 5'GCACUUU3'.

Um den regulatorischen Einfluss der Bindestelle auf die mRNA Expression von HIF-1 α zu untersuchen, wurde diese mutiert und das Vektorkonstrukt anschließend zusammen mit der miR-93 bzw. antimiR-93 (anti-93) als Negativ-Kontrolle in HEK-293 Zellen kotransfiziert. Die folgende luminometrische Bestimmung der Luciferase Aktivität zeigte im Vergleich zu der Negativ-Kontrolle nach Mutation der Bindestelle eine Aufhebung des regulatorischen Effekts. Die Wildtyp Transfektion des HIF-1 α 3'UTRs führte zu einer Verminderung der relativen Luciferase Aktivität auf das 0.66 ± 0.03 -fache. Nach Mutation der miR-93 Bindestelle entsprach die relative Luciferase Aktivität dem 1.20 ± 0.07 -fachen.

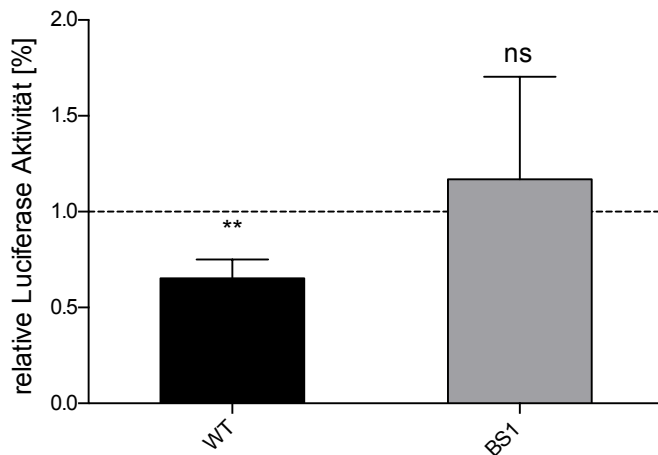


Abbildung 16: Sequentielle Mutagenese des HIF-1 α 3'UTRs

- (a) Relative Luciferase Aktivität des HIF-1 α Vektorkonstrukts nach Kotransfektion des Wildtyp (WT; n=9) bzw. mutierten Plasmids (BS1; n=3) und miR-93/ miR-NC. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; paired Student's t-test, ns= nicht signifikant; **p < 0.01. Zu erkennen ist der regulatorische Effekt der Bindestelle. Die Werte entsprechen RenillaLuciferase/FireflyLuciferase Expression relativ zur Transfektions-Negativkontrolle.

5.8 MiR-93 reduziert die U87 Zellmigration und hindert die Angiogenese in Endothelzellen

Nachdem gezeigt wurde, dass die Überexpression von miR-93 in GBM Zellen zu einer starken Hemmung der tumorigenen Zytokinexpression und Sekretion führt, wurde als nächstes der funktionelle Einfluss einer miR-93 Re-expression auf die zentralen Tumormerkmale Migration und Angiogenese geprüft. Dazu wurden native U87 Zellen mit Überstand von miR-93 transfizierten GBM Zellen inkubiert, die mit IL-1 β stimuliert und in 5% O₂ inkubiert wurden. Anschließend wurde durch 2D Migrationsassays der Einfluss des GBM Zellüberstands auf die Tumorzellmigration der U87 Zellen untersucht. Dies zeigte eine deutliche Abnahme der Zellmigration (Abbildung 17).

Weiterhin führte die Inkubation von HUVECs mit dem oben genannten Überstand zu einer deutlich sichtbar reduzierten Tube Formation, was auf eine Herunterregulation des angiogenen Potentials der Zellen hindeutete.

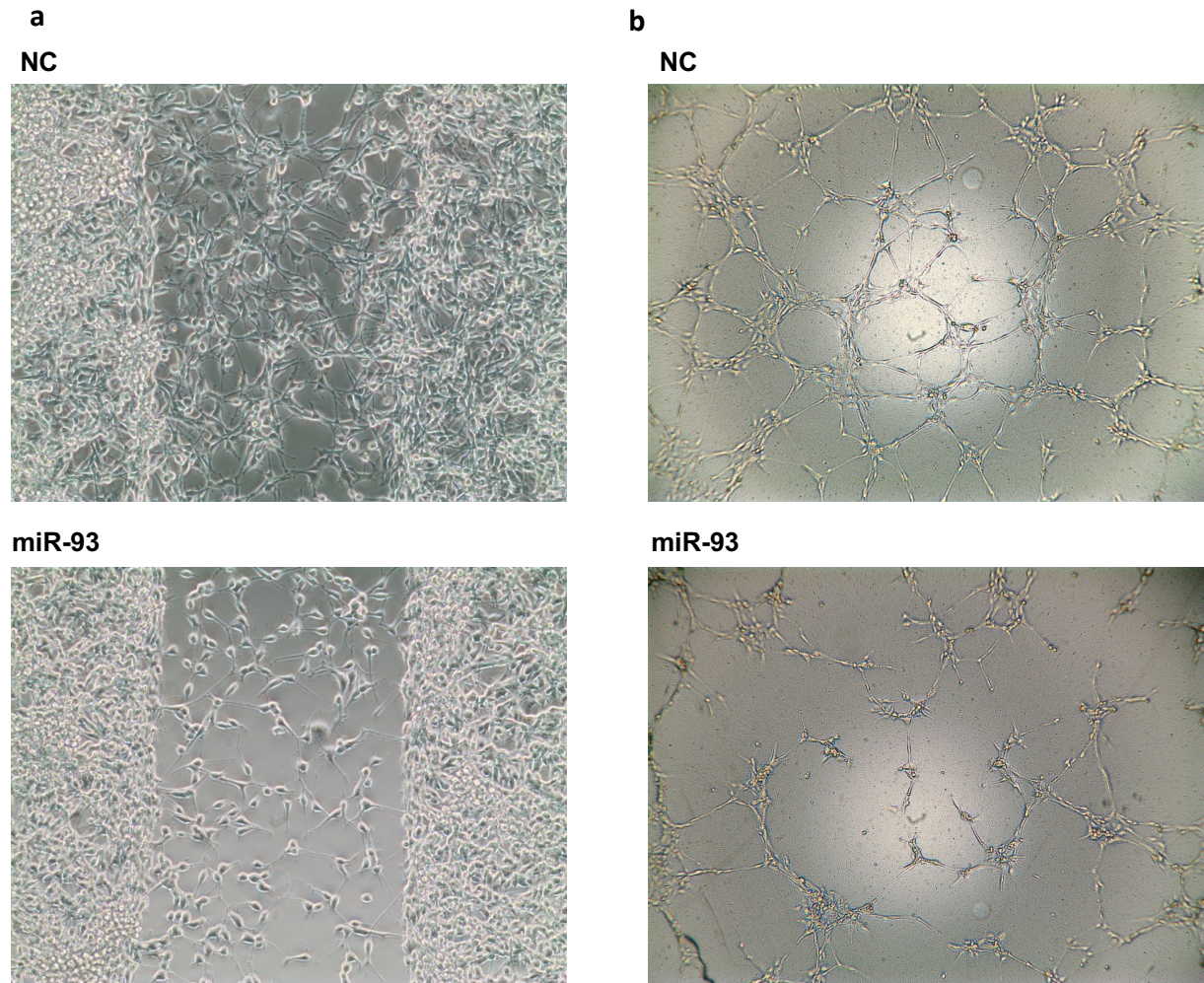


Abbildung 17: Funktionelle Relevanz der miR-93 im Hinblick auf zentrale Tumoreigenschaften; a) Verringerung der Migration und b) Reduktion des angiogenetischen Potenzials

Kultivierung von a) nativen U87 Zellen und b) HUVEC Zellen für a) 24 Stunden und b) 4 Stunden mit Überstand von miR-93/NC transfizierten U87 Zellen, die mit IL-1 β stimuliert und in 5% Hypoxie inkubiert wurden. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Abbildung aus n=3 Einzelversuchen.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass durch miR-93 hervorgerufene Reduktion der inflammatorischen Zytokinsekretion zu einer funktionellen Einschränkung der GBM Tumorzellmigration führt und das angiogene Potential von Endothelzellen vermindert.

6 Diskussion

GBMs proliferieren in einer vielschichtigen inflammatorischen Mikroumgebung. Diese stimuliert wesentliche tumorigene Zelleigenschaften und ist für den aggressiven Phänotyp des GBMs mitverantwortlich. Auf der Suche nach potenten Kontrollmechanismen geraten miRNAs zunehmend in den Blickpunkt. Mehr als die Hälfte des Transkriptoms und zahlreiche Genkaskaden stehen unter dem Einfluss post-transkriptioneller miR-Regulation [71]. Insbesondere die sogenannten Immuno-miRs gelten als Feinmodulatoren inflammatorischer Signalwege [84] und könnten als antiinflammatorische Tumorsuppressoren in therapeutischen Ansätzen relevant sein.

In der vorgelegten Arbeit wurde die Rolle der Immuno-miR-93 im GBM untersucht. Erstmals konnte eine drastisch verminderte miR-93 Expression in GBM-Biopsaten, U87, T98G und primären GBM-Zelllinien im Vergleich zu Normalhirngewebe nachgewiesen werden. Die Re-Expression der miR-93 führte zu einem antiinflammatorischen Zytokinexpressionsprofil in GBM Zellen. Dieser Phänotyp konnte durch direkte miR-93 Regulation der Zielgene LIF, IL-6, Map3K2, G-CSF und HIF-1 α erklärt werden. Schließlich reduzierte die miR-93 Re-Expression auch wesentliche funktionelle Tumoreigenschaften des GBMs, nämlich Migration und Angiogenese. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die Immuno-miR-93 im GBM ein Tumorsuppressor ist, der die inflammatorische Zytokinsekretion der Tumorzellen reduziert und zu einem benigneren Zellphänotyp führt.

In dieser Arbeit wurden Experimente in drei verschiedenen GBM-Zelllinien – U87, T98G und Primärzellen – durchgeführt. Für U87 und T98G Zellen konnte gezeigt werden, dass diese sich *in vitro* als GBM-Tumormodell eignen. Patil et al. untersuchten die molekularen Charakteristika einer Reihe von GBM-Zelllinien im Vergleich zu GBM-Zellen aus der sog. *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) Datenbank, welche komplette Tumorgenome aus Tumorzellen sequenziert [121]. Für U87 und T98G wurde eine über 70%-ige Übereinstimmung mit TCGA-GBM Zellen gezeigt.

Des Weiteren ist die Verwendung von GBM-Primärzelllinien eines der wichtigsten Modelle zur Untersuchung von GBMs [122]. Hierzu wurden Primärzellen aus Tumorgewebe von GBM-Resektionen isoliert und kultiviert. Primärkulturen sind den herkömmlichen Kulturmodellen überlegen, da sie eine größere Ähnlichkeit mit dem Primärtumor beibehalten [123]. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse in den drei verschiedenen Zelllinien übereinstimmende Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses von miR-93 auf die inflammatorische Genexpression.

Dennoch handelt es sich bei der hier vorgestellten Arbeit um eine *in vitro* Studie, die per definitionem außerhalb des lebenden Organismus erfolgt und deshalb nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar ist. Ein wesentlicher Nachteil von *in vitro* Studien ist das Fehlen von *in-vivo* Tumorphysiologie und Biokinetik, die auf dem vielschichtigen Zusammenspiel verschiedener Zellentitäten beruht. Dies kann zu einer Fehlinterpretation von *in-vitro* Daten führen [124]. Zur Reduktion von Tierversuchen stellen *in vitro* Arbeiten jedoch die Grundlage für *in vivo* Forschungsvorhaben. Zur weiteren Erforschung der Rolle der miR-93 auf inflammatorische Signalwege im GBM könnten in einem nächsten Schritt Untersuchungen im syngenen immunkompetenten Tumor-Mausmodell erfolgen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass GBM-Zellen hochaffin auf inflammatorische Stimulation durch IL-1 β , oder den Überstand stimulierter PBMCs, reagieren. IL-1 β ist der zentrale Mediator unspezifischer Inflammation und wird allgemein zur Stimulation von Tumorzellen *in vitro* verwendet [101,125,126]. Des Weiteren wurden die Zellen mit dem Überstand stimulierter PBMCs inkubiert, um *in vitro* eine bestmögliche Simulation des sogenannten „tumor microenvironments“ zu erreichen und einen selektiven Einfluss von IL-1 β auf die Ergebnisse auszuschließen. Beide Versuchsansätze zeigten eine starke Induktion der inflammatorischen Genexpression. Die mRNA Expression von LIF-, IL-1 β -, COX2-, IL-8-, IL-6-, CXCL5- und G-CSF wurde in GBM Zellen nach Inkubation mit IL-1 β und dem Überstand stimulierter PBMCs deutlich hochreguliert. Für die Proteinbestimmung aus Zellüberständen mittels ELISA und Multiplex Assay erfolgte ebenfalls die Stimulation mit IL-1 β , nicht aber mit dem Überstand stimulierter PBMCs, um die Ergebnisse nicht durch bereits im Zellüberstand vorhandene Zytokine zu verfälschen. In U87 und T98G Zellen kam es nach inflammatorischer Stimulation zur Sekretion erheblicher Zytokinmengen. Dies lässt darauf schließen, dass die inflammatorische Mikroumgebung des GBMs nur zum Teil auf die den Tumor umgebenden Immuneffektorzellen zurückzuführen ist. Vielmehr sind die Tumorzellen selbst wichtiger Bestandteil des Entzündungsprozesses: GBM-Zellen produzieren durch die hoch stimulierende Mikroumgebung selbst erhebliche Mengen immunmodulierender Mediatoren und verstärken dadurch die Entzündungskaskade. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit Untersuchungen von Tarassishin *et al.* und Yeung *et al.*, die erhöhte Zytokinexpression in GBM Biopsaten und in U251 Zellen nach IL-1 β Stimulation fanden [101,127].

Im Folgenden wird die Bedeutung der durch die inflammatorische Stimulation hochregulierten Gene im Hinblick auf die Tumorigenität des GBMs erläutert:

LIF induziert die Selbsterneuerung und Regeneration von glioma stem cells (GSCs) [106]. Diese sind verantwortlich für Tumorigenität, Proliferation, Wiederauftreten und

Therapieresistenz des GBMs [128]. GSCs sind potenziell ein Angriffspunkt neuer Therapien [129] und LIF wird dabei als mögliches therapeutisches Zielgen beschrieben [106].

IL-1 β ist der zentrale Neuroinflammationsmediator. Seine Überexpression führt zu einer systemischen inflammatorischen Reaktion. Dabei kommt es IL-1 vermittelt zur Stimulation multipler nachgeschalteter proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Prostaglandine [53,54,130].

COX-2 ist ein Enzym der Prostaglandinsynthese. Es wird nach inflammatorischer Stimulation vermehrt transkribiert. Insbesondere die vermehrte Produktion von Prostaglandin E₂ (PGE₂) wirkt tumorigen. Es fördert Tumorzell-Adhäsion, Migration, Metastasierung, Angiogenese und Immunsuppression [131-133]. Hochregulation von COX-2 geht im GBM mit einer erhöhten Tumoraggressivität einher [47]. Nach Tumorresektion finden sich verringerte PGE₂ Spiegel im Patientenplasma [134]. Eine Verringerung der GBM Inzidenz nach regelmäßiger Einnahme von COX-Hemmern wird diskutiert [135].

Im Zentrum des GBMs kommt es zu hypoxischem Zelluntergang durch inadäquate Gefäßversorgung [136]. Die für das GBM typischen Pseudopalisaden entstehen durch Tumorzellen, die von einer zentralen hypoxischen Region migrieren und eine invasive Front am Rande des Tumors bilden [59]. Die Zellen sezernieren in hohem Maße das für Angiogenese und Tumorpheriferation relevante IL-8 [65,137].

Die Expression von IL-6 wird im GBM als Marker für Tumoraggressivität genutzt [138]. In GSCs führt das gezielte Ausschalten von IL-6 Rezeptoren zu vermindertem Zellwachstum und vermehrter Apoptose. IL-6 Antikörper können das Tumorwachstum von GSCs verringern [103].

Die Überexpression von CXCL5 in GBMs fördert Proliferation und Migration von U87 GBM Zellen [139].

In Gliomen zeigt sich eine Hochregulation von G-CSF und vom G-CSF Rezeptor. Dies steigert die Proliferation, Migration und Invasion der Zellen. Im Umkehrschluss führt die Antagonisierung des G-CSF Rezeptors zur Verringerung von Tumorwachstum und Metastasierung [140].

Zusammengefasst steigert die vermehrte Expression der oben beschriebenen Gene die tumorigenen Eigenschaften der GBM Zellen. Die Zytokinsekretion amplifiziert zusätzlich die inflammatorische Mikroumgebung. Immuneffektorzellen und Tumorzellen werden dadurch

immer weiter zur Sekretion von Inflammationsmediatoren stimuliert, wodurch ein „Teufelskreis“ entsteht. Das Unterbrechen dieser „Inflammationsspirale“ sollte Ziel neuer therapeutischer Ansätze sein. MiRNAs könnten in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle spielen. Sie sind kurze RNA-Moleküle, die die Genexpression posttranskriptionell regulieren und in zahlreichen immunologischen Vorgängen von Bedeutung sind. Die Immuno-miR-93 reguliert in verschiedenen Zellentitäten inflammatorische Signalwege [85,87-91]. IL-8 konnte in Leiomyomzellen als direktes miR-93 Zielgen nachgewiesen werden [85]. Xu et al. identifizierten am Rattenmodell der Endotoxin-induzierten Uveitis IRAK4 als direktes miR-93 Target in LPS -stimulierten Makrophagen. Dadurch wurde die Aktivierung des NF- κ B Signalwegs inhibiert und die Expression proinflammatorischer Zytokine reprimiert [87]. In Endometriosezellen konnte eine direkte miR-93 Regulation der MMP-3 und des VEGF gezeigt werden, was die Migration und Invasion von endometrialen Stroma Zellen inhibierte [89]. Li et al. konnten in induzierten pluripotenten Stammzellen eine direkte Interaktion der miR-93 mit dem 3'UTR des TGFBR2 nachweisen [90,91].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese miRNA in GBM-Biopsaten und GBM- Primärzelllinien signifikant vermindert exprimiert wird. Dies deutet erstmals darauf hin, dass die miR-93 auch im GBM eine antiinflammatorische, tumorsuppressive Wirkung hat und deshalb vom Tumor reprimiert wird.

Um die funktionelle Relevanz von miR-93 im Hinblick auf die Expression von inflammatorischen Genen im GBM zu untersuchen, wurden GBM Zelllinien mit einer Vorläufer-miR-93 transfiziert. Die Durchführung einer Microarray-Analyse von miR-93 transfizierten, IL-1 β stimulierten U87 Zellen zeigte eine überproportional hohe Regulation von inflammatorischen und hypoxischen Genen. Dabei war insbesondere die Herunterregulation von HIF-1 α und Map3K2 interessant, welche später in verschiedenen GBM-Zelllinien durch qPCR und Western-Blot auf mRNA und Proteinebene validiert werden konnte. Beide Gene sind zentrale Mediatoren hypoxischer und inflammatorischer Signalwege. HIF-1 α vermittelt als Transkriptionsfaktor im GBM das onkogene Potenzial einer hypoxischen Zellumgebung. Bei Sauerstoffmangel induziert HIF-1 α eine inflammatorische, tumorigene Signalkaskade [46], die die Invasion und Progression des GBMs steigert [60,141]. Map3K2 erhöht als Antwort auf inflammatorische Stimuli die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B [108]. NF- κ B wiederum reguliert die Expression von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Akute-Phase Proteinen, Immunorezeptoren, Zelladhäsions-Molekülen und Apoptose-Regulatoren [142].

Zusätzlich kam es bei inflammatorisch stimulierten GBM Zellen nach miR-93 Transfektion zu einer signifikanten Reduktion von IL-6, G-CSF, IL-8, COX2, IL-1 β , CXCL5 und LIF auf mRNA und Proteinebene. Die miR-93 Re-Expression antagonisierte dabei das vorher in stimulierten

Nativzellen beschriebene Zytokinexpressionsprofil und erzeugte somit einen deutlich antiinflammatorischen Zellphänotyp.

Diese Ergebnisse konnten auch unter maximaler inflammatorischer Stimulation der GBM Zellen reproduziert werden. Inflammation und Hypoxie sind im GBM stark miteinander verwoben und können sich gegenseitig induzieren [69,141]. Der Sauerstoffmangel im aggressiv wachsenden GBM verstärkt die inflammatorische Mikroumgebung. Ziel war es, durch gleichzeitige Stimulation mit IL-1 β und Inkubation in 5% O₂ *in vitro* eine möglichst tumorphysiologische Mikroumgebung abzubilden. MiR-93 Transfektion von U87 Zellen unter oben genannten Bedingungen resultierte schließlich auch in signifikanter Herunterregulation von IL-6, G-CSF, IL-8, COX2, IL-1 β , CXCL5 und LIF.

Im weiteren experimentellen Verlauf stellte sich die Frage, über welche direkten miR-93 Zielgene das antiinflammatorische Genexpressionsprofil entsteht. In der vorliegenden Dissertation konnte erstmals luminometrisch gezeigt werden, dass LIF, IL-6, G-CSF, HIF-1 α und Map3K2 direkte miR-93 Zielgene sind. Für COX-2 und CXCL5 konnte keine direkte miR-93 Regulation nachgewiesen werden. Ihre Expression wird sowohl durch inflammatorische, als auch hypoxische Signalwege induziert [113-116]. Deren Schlüsselgene, Map3K2 und HIF-1 α , sind neu identifizierte miR-93 Zielgene. Im nächsten Schritt sollte ermittelt werden, ob die Expressionsminderung von COX2 und CXCL5 also indirekt durch eine Regulation der neu identifizierten miR-93 Zielgene zu erklären war. Die zielgerichtete Inhibition dieser Zielgene durch spezifischen Gen-Knockdown zeigte tatsächlich eine reproduzierbare, signifikante Reduktion der COX2 und CXCL5 mRNA Expression.

Somit konnte gezeigt werden, dass der antiinflammatorische Phänotyp nach Immuno-miR-93 Transfektion in GBM-Tumorzelllinien durch direkte RNA Interferenz mit den 3'UTRs von LIF, IL-6, G-CSF, HIF-1 α und Map3K2 entsteht.

Für Map3K2 und HIF-1 α , die beiden zentralen Mediatoren inflammatorischer und hypoxischer Signalwege, wurde eine detaillierte Analyse der miR-93 Bindestellen im jeweiligen 3'UTR durchgeführt. Mithilfe des Programms TargetScanHuman 4.2 konnten potenzielle microRNA – mRNA Interaktionen vorhergesagt und miR-Bindestellen im 3'UTR der Zielgene identifiziert werden [143]. Für Map3K2 wurden zwei potenzielle Bindestellen ermittelt, für HIF-1 α lediglich eine. Sequentielle Mutation der jeweiligen Bindestellen durch Basenaustausch zeigte einen additiven Effekt der miR-93 induzierten Regulation von Map3K2 über die zwei Bindestellen. Die Aufhebung aller miR-93-Bindestellen führte bei Map3K2 und HIF-1 α zu einer vollständigen Aufhebung der Regulation.

Abschließend wurde die funktionelle Relevanz des antiinflammatorischen Phänotyps nach miR-93 Transfektion im Hinblick auf charakteristische GBM Tumoreigenschaften geprüft. Wie oben im Detail beschrieben unterliegt die Migration und Angiogenese im GBM auch dem Expressionsprofil der Gene IL-6, G-CSF, IL-8, COX2, IL-1 β , CXCL5, LIF, Map3K2 und HIF-1 α . Eine Regulation dieser Gene durch die miR-93 sollte demnach in einer Reduktion des Migrations- und Angiogenesepotenzials resultieren. Tatsächlich zeigte sich nach Inkubation von GBM Zellen mit dem Überstand von stimulierten, miR-93 transfizierten Zellen eine signifikante Reduktion der Zellmigration und Angiogenese im Migrations- und Tube Formation Assay und damit eine Verminderung der tumorigenen Eigenschaften der GBM-Zellen.

Folgende Schlussfolgerung kann gezogen werden: die Re-Expression der Immuno-miR-93 in GBM-Zelllinien führt über die Zielgene LIF, IL-6, G-CSF, HIF-1 α und Map3K2 zu einem antiinflammatorischen Phänotyp und zu einer Benignisierung der Zellen. Die Antagonisierung der tumorigenen Zytokinsekretion bremst essentielle Tumoreigenschaften, nämlich Migration und Angiogenese. Durch Regulation des vielschichtigen und hochkomplexen inflammatorischen Netzwerks fungiert die Immuno-miR-93 im GBM somit als Tumorsuppressor. Dies begründet die im GBM beobachtete Reduktion der miR-93 Expression, um die Tumorigenität der Zellen zu erhöhen.

Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit könnten neue Impulse für zukünftige therapeutische Ansätze liefern. Eine dauerhafte Überexpression von miR-93 könnte die Tumorigenität des GBMs vermindern. Die klinische Anwendung muss Gegenstand von zukünftigen Studien sein.

7 Zusammenfassung

Das GBM bleibt nach Ausschöpfung aller therapeutischen Maßnahmen unheilbar. Trotz radikaler Tumorresektion und Radiochemotherapie beträgt die mediane Überlebenszeit nur 15 Monate. Als vielversprechender Ansatzpunkt für neue Behandlungsstrategien gilt derzeit die Immunologie.

GBM Zellen sind einer inflammatorischen Tumorumgebung ausgesetzt. Diese wird durch Zellen des angeborenen Immunsystems, stimulierte Immunzellen und inflammatorische Mediatoren aufrechterhalten. GBM-Zellen amplifizieren die Entzündungskaskade durch Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren. Der resultierende „Immuncocktail“ trägt durch Steigerung von Migration, Proliferation und Angiogenese wesentlich zur Aggressivität des Tumors bei. Immuno-miRs sind Regulatoren inflammatorischer Signalwege und könnten einen wichtigen Kontrollmechanismus der tumorigenen Immunreaktion darstellen.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die Rolle der Immuno-miR-93 im GBM untersucht. Erstmals konnte in GBM-Biopsaten und Primärzelllinien im Vergleich zu Normalhirngewebe eine signifikant verminderte miR-93 Expression nachgewiesen werden. Die Re-Expression der miR-93 führte zu einem antiinflammatorischen Genexpressionsprofil mit signifikant reduzierter Expression von IL-6, G-CSF, IL-8, COX2, IL-1 β , CXCL5, LIF, Map3K2 und HIF-1 α auf mRNA und Proteinebene. Dieser antiinflammatorische Phänotyp beruht auf direkter miR-93 Regulation der neu identifizierten Zielgene LIF, IL-6, G-CSF, HIF-1 α und Map3K2. Durch die Antagonisierung der tumor-induzierten Zytokinexpression inhibierte die miR-93 Tumorzellmigration und Angiogenese und hinderte somit wesentliche tumorigene Eigenschaften der GBM-Zellen.

Zusammengefasst fungiert die Immuno-miR-93 im GBM als antiinflammatorischer Tumorsuppressor. Sie reguliert zentrale Gene des vielschichtigen und hochkomplexen inflammatorischen Netzwerks und führt so zu einem benigneren Zellphänotyp. Die Aggressivität des GBMs wird maßgeblich durch inflammatorische Stimulation und die damit verbundene Zellreaktion definiert. Immuno-miR-93 antagonisiert diesen Mechanismus und kann so die Pathophysiologie des Tumors durchbrechen – ein Aspekt der für zukünftige therapeutische Ansätze von Relevanz sein könnte.

8 Summary

GBMs are devastating tumors with poor prognosis. Despite current multi-modal treatment concepts, median survival time is approximately 15 months. Immunology is currently considered a promising target for new treatment strategies.

GBM cells are surrounded by an inflammatory microenvironment mostly driven by the innate immunity, consisting of stimulated immune cells and inflammatory mediators. GBM cells amplify the inflammatory cascade by producing considerable amounts of cytokines, chemokines and growth factors. The resulting immune “cocktail” enhances angiogenesis, migration and invasiveness of GBM cells and thus consolidates their highly aggressive phenotype. In this scenario, immuno-miRs might reveal as potent regulators of inflammatory gene expression and thus could open up new therapeutic perspectives.

This study focused on identifying the role of immuno-miR-93 in GBM. GBM tissue and primary GBM cell lines showed a sharp downregulation of miR-93. Re-expression of miR-93 evoked an anti-inflammatory gene expression profile. In specific, mRNA and protein levels of IL-6, G-CSF, IL-8, COX2, IL-1 β , CXCL5, LIF, Map3K2 and HIF-1 α were found to be significantly repressed after re-expression of miR-93. Target validation identified LIF, IL-6, G-CSF, HIF-1 α and Map3K2 as novel miR-93 targets that induced the changes in the GBM secretome. The reduction in secretion of tumor-promoting cytokines by miR-93 substantially suppressed GBM cell migration and angiogenesis, two hallmarks of GBM tumor progression.

Taken together, immuno-miR-93 acts as a tumor suppressor that is able to put a brake on tumor-derived inflammation. MiR-93 targets central regulatory hubs within the complex and multilayered network of inflammation, leading to a more benign cell phenotype. GBM aggressiveness is significantly defined by inflammatory stimulation and the associated cell reaction. Immuno-miR-93 antagonizes this pathophysiological mechanism which could provide new impulses for future therapeutic approaches.

9 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht.

Publikation in Fachzeitschriften:

Hubner M*, **Moellhoff N***, Effinger D, et al. MicroRNA-93 acts as an "anti-inflammatory tumor suppressor" in glioblastoma. Neurooncol Adv. 2020;2(1):vdaa047.

*shared first authorship

Abstract und Poster:

Hübner M, Effinger D, Hinske C, **Möllhoff N**, Kreth F-W, Kreth S. TMIC-24. TUMOR-SUPPRESSIVE AND ANTI-INFLAMMATORY microRNA-93 IS DECREASED IN GLIOBLASTOMA PATIENTS. Neuro-oncology. 2018;20(suppl_6):vi261-vi261.

10 Literaturverzeichnis

1. Hacke, W. *Neurologie*, (Springer- Verlag Berlin Heidelberg, 2010).
2. Tamimi, A.F. & Juweid, M. Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. in *Glioblastoma* (ed. De Vleeschouwer, S.) (Brisbane (AU), 2017).
3. Fisher, J.L., Schwartzbaum, J.A., Wrensch, M. & Wiemels, J.L. Epidemiology of brain tumors. *Neurologic clinics* **25**, 867-890, vii (2007).
4. Ostrom, Q.T., *et al.* CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-oncology* **15 Suppl 2**, ii1-56 (2013).
5. Noroxe, D.S., Poulsen, H.S. & Lassen, U. Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. *ESMO Open* **1**, e000144 (2016).
6. Urbanska, K., Sokolowska, J., Szmidt, M. & Sysa, P. Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemporary oncology* **18**, 307-312 (2014).
7. Giese, A., Bjerkvig, R., Berens, M.E. & Westphal, M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **21**, 1624-1636 (2003).
8. Thon, N., Kreth, S. & Kreth, F.W. Personalized treatment strategies in glioblastoma: MGMT promoter methylation status. *OncoTargets and therapy* **6**, 1363-1372 (2013).
9. Dziurzynski, K., *et al.* Butterfly glioblastomas: a retrospective review and qualitative assessment of outcomes. *Journal of neuro-oncology* **109**, 555-563 (2012).
10. Plate, K.H., Breier, G., Weich, H.A. & Risau, W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* **359**, 845-848 (1992).
11. Norden, A.D., Drappatz, J. & Wen, P.Y. Antiangiogenic therapies for high-grade glioma. *Nature reviews. Neurology* **5**, 610-620 (2009).
12. Yancopoulos, G.D., *et al.* Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407**, 242-248 (2000).
13. Wu, C.X., *et al.* Peritumoral edema shown by MRI predicts poor clinical outcome in glioblastoma. *World journal of surgical oncology* **13**, 97 (2015).
14. Siegal, T. Clinical impact of molecular biomarkers in gliomas. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* **22**, 437-444 (2015).
15. Sparmann, A. & Bar-Sagi, D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer cell* **6**, 447-458 (2004).
16. Pegg, A.E. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutation research* **462**, 83-100 (2000).

17. Hegi, M.E., *et al.* MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England journal of medicine* **352**, 997-1003 (2005).
18. Reifenberger, G., *et al.* Predictive impact of MGMT promoter methylation in glioblastoma of the elderly. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **131**, 1342-1350 (2012).
19. Ahluwalia, M.S. American Society of Clinical Oncology 2011 CNS tumors update. *Expert review of anticancer therapy* **11**, 1495-1497 (2011).
20. Gerson, S.L. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nature reviews. Cancer* **4**, 296-307 (2004).
21. Alifieris, C. & Trafalis, D.T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacology & therapeutics* (2015).
22. Preusser, M., *et al.* Current concepts and management of glioblastoma. *Annals of neurology* **70**, 9-21 (2011).
23. Mabray, M.C., Barajas, R.F., Jr. & Cha, S. Modern brain tumor imaging. *Brain tumor research and treatment* **3**, 8-23 (2015).
24. Kleihues, P. & Ohgaki, H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-oncology* **1**, 44-51 (1999).
25. Stupp, R., *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine* **352**, 987-996 (2005).
26. Stummer, W., *et al.* Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The Lancet. Oncology* **7**, 392-401 (2006).
27. Leroy, H.A., Vermandel, M., Lejeune, J.P., Mordon, S. & Reyns, N. Fluorescence guided resection and glioblastoma in 2015: A review. *Lasers Surg Med* **47**, 441-451 (2015).
28. Stupp, R., *et al.* High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **25 Suppl 3**, iii93-101 (2014).
29. Stupp, R., *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet. Oncology* **10**, 459-466 (2009).
30. Guyotat, J., *et al.* Is reoperation for recurrence of glioblastoma justified? *Oncology reports* **7**, 899-904 (2000).
31. Barker, F.G., 2nd, *et al.* Survival and functional status after resection of recurrent glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* **42**, 709-720; discussion 720-703 (1998).

32. Niyazi, M., *et al.* Therapeutic options for recurrent malignant glioma. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* **98**, 1-14 (2011).
33. Archavlis, E., Tselis, N., Birn, G., Ulrich, P. & Zamboglou, N. Combined salvage therapies for recurrent glioblastoma multiforme: evaluation of an interdisciplinary treatment algorithm. *Journal of neuro-oncology* **119**, 387-395 (2014).
34. Wang, Y. & Jiang, T. Understanding high grade glioma: molecular mechanism, therapy and comprehensive management. *Cancer letters* **331**, 139-146 (2013).
35. Wainwright, D.A., *et al.* Durable therapeutic efficacy utilizing combinatorial blockade against IDO, CTLA-4, and PD-L1 in mice with brain tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**, 5290-5301 (2014).
36. Balkwill, F., Charles, K.A. & Mantovani, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer cell* **7**, 211-217 (2005).
37. Samadi, A.K., *et al.* A multi-targeted approach to suppress tumor-promoting inflammation. *Seminars in cancer biology* (2015).
38. Grivennikov, S.I., Greten, F.R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883-899 (2010).
39. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436-444 (2008).
40. Hussain, S.P. & Harris, C.C. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **121**, 2373-2380 (2007).
41. Itzkowitz, S.H. & Yio, X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**, G7-17 (2004).
42. Berasain, C., *et al.* Inflammation and liver cancer: new molecular links. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1155**, 206-221 (2009).
43. Macarthur, M., Hold, G.L. & El-Omar, E.M. Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**, G515-520 (2004).
44. Karin, M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* **441**, 431-436 (2006).
45. Yu, H., Kortylewski, M. & Pardoll, D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature reviews. Immunology* **7**, 41-51 (2007).

46. Jung, Y.J., Isaacs, J.S., Lee, S., Trepel, J. & Neckers, L. IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**, 2115-2117 (2003).
47. Shono, T., Tofilon, P.J., Bruner, J.M., Owolabi, O. & Lang, F.F. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. *Cancer research* **61**, 4375-4381 (2001).
48. Grivennikov, S.I. & Karin, M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine & growth factor reviews* **21**, 11-19 (2010).
49. Yu, H., Pardoll, D. & Jove, R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature reviews. Cancer* **9**, 798-809 (2009).
50. Zhu, V.F., Yang, J., Lebrun, D.G. & Li, M. Understanding the role of cytokines in Glioblastoma Multiforme pathogenesis. *Cancer letters* **316**, 139-150 (2012).
51. Charles, N.A., Holland, E.C., Gilbertson, R., Glass, R. & Kettenmann, H. The brain tumor microenvironment. *Glia* **59**, 1169-1180 (2011).
52. Yeung, Y.T., McDonald, K.L., Grewal, T. & Munoz, L. Interleukins in glioblastoma pathophysiology: implications for therapy. *British journal of pharmacology* **168**, 591-606 (2013).
53. Basu, A., Krady, J.K. & Levison, S.W. Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation. *J Neurosci Res* **78**, 151-156 (2004).
54. Griffin, B.D. & Moynagh, P.N. Persistent interleukin-1beta signaling causes long term activation of NFkappaB in a promoter-specific manner in human glial cells. *The Journal of biological chemistry* **281**, 10316-10326 (2006).
55. Karin, M. & Greten, F.R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature reviews. Immunology* **5**, 749-759 (2005).
56. Sayour, E.J., *et al.* Increased proportion of FoxP3+ regulatory T cells in tumor infiltrating lymphocytes is associated with tumor recurrence and reduced survival in patients with glioblastoma. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **64**, 419-427 (2015).
57. Ooi, Y.C., *et al.* The role of regulatory T-cells in glioma immunology. *Clinical neurology and neurosurgery* **119**, 125-132 (2014).
58. Nduom, E.K., Weller, M. & Heimberger, A.B. Immunosuppressive mechanisms in glioblastoma. *Neuro-oncology* **17 Suppl 7**, vii9-vii14 (2015).
59. Brat, D.J., *et al.* Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer research* **64**, 920-927 (2004).
60. Monteiro, A.R., Hill, R., Pilkington, G.J. & Madureira, P.A. The Role of Hypoxia in Glioblastoma Invasion. *Cells* **6**(2017).

61. Yang, L., Lin, C., Wang, L., Guo, H. & Wang, X. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in glioblastoma multiforme progression and therapeutic implications. *Exp Cell Res* **318**, 2417-2426 (2012).
62. Wenger, R.H., Stiehl, D.P. & Camenisch, G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2005**, re12 (2005).
63. Choi, K.S., Bae, M.K., Jeong, J.W., Moon, H.E. & Kim, K.W. Hypoxia-induced angiogenesis during carcinogenesis. *Journal of biochemistry and molecular biology* **36**, 120-127 (2003).
64. Vakkila, J. & Lotze, M.T. Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nature reviews. Immunology* **4**, 641-648 (2004).
65. Brat, D.J., Bellail, A.C. & Van Meir, E.G. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-oncology* **7**, 122-133 (2005).
66. Jensen, R.L. Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target. *Journal of neuro-oncology* **92**, 317-335 (2009).
67. Lu, Z., *et al.* Hyperbaric oxygen therapy sensitizes nimustine treatment for glioma in mice. *Cancer Med* **5**, 3147-3155 (2016).
68. Sharma, V., Dixit, D., Koul, N., Mehta, V.S. & Sen, E. Ras regulates interleukin-1beta-induced HIF-1alpha transcriptional activity in glioblastoma. *Journal of molecular medicine* **89**, 123-136 (2011).
69. D'Ignazio, L., Bandarra, D. & Rocha, S. NF-kappaB and HIF crosstalk in immune responses. *The FEBS journal* **283**, 413-424 (2016).
70. Taylor, C.T. Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-kappaB in hypoxic inflammation. *The Journal of physiology* **586**, 4055-4059 (2008).
71. Bartel, D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215-233 (2009).
72. Bartel, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297 (2004).
73. Huntzinger, E. & Izaurralde, E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature reviews. Genetics* **12**, 99-110 (2011).
74. Pasquinelli, A.E. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature reviews. Genetics* **13**, 271-282 (2012).
75. Kohlhapp, F.J., Mitra, A.K., Lengyel, E. & Peter, M.E. MicroRNAs as mediators and communicators between cancer cells and the tumor microenvironment. *Oncogene* (2015).

76. Carthew, R.W. & Sontheimer, E.J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**, 642-655 (2009).
77. Barbano, R., *et al.* A miRNA signature for defining aggressive phenotype and prognosis in gliomas. *PloS one* **9**, e108950 (2014).
78. Liu, C.G., *et al.* An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9740-9744 (2004).
79. Lu, J., *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834-838 (2005).
80. Schickel, R., Boyerinas, B., Park, S.M. & Peter, M.E. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene* **27**, 5959-5974 (2008).
81. Schetter, A.J., Heegaard, N.H. & Harris, C.C. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis* **31**, 37-49 (2010).
82. O'Connell, R.M., Rao, D.S. & Baltimore, D. microRNA regulation of inflammatory responses. *Annual review of immunology* **30**, 295-312 (2012).
83. Baltimore, D., Boldin, M.P., O'Connell, R.M., Rao, D.S. & Taganov, K.D. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nature immunology* **9**, 839-845 (2008).
84. Hirschberger, S., Hinske, L.C. & Kreth, S. MiRNAs: dynamic regulators of immune cell functions in inflammation and cancer. *Cancer letters* **431**, 11-21 (2018).
85. Chuang, T.D., Luo, X., Panda, H. & Chegini, N. miR-93/106b and their host gene, MCM7, are differentially expressed in leiomyomas and functionally target F3 and IL-8. *Molecular endocrinology* **26**, 1028-1042 (2012).
86. Poliseno, L., *et al.* Identification of the miR-106b~25 microRNA cluster as a proto-oncogenic PTEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation. *Science signaling* **3**, ra29 (2010).
87. Xu, Y., *et al.* MicroRNA-93 inhibits inflammatory cytokine production in LPS-stimulated murine macrophages by targeting IRAK4. *FEBS letters* **588**, 1692-1698 (2014).
88. Yu, X.F., Zou, J., Bao, Z.J. & Dong, J. miR-93 suppresses proliferation and colony formation of human colon cancer stem cells. *World journal of gastroenterology : WJG* **17**, 4711-4717 (2011).
89. Lv, X., Chen, P. & Liu, W. Down regulation of MiR-93 contributes to endometriosis through targeting MMP3 and VEGFA. *Am J Cancer Res* **5**, 1706-1717 (2015).
90. Wang, H., *et al.* miR-106b aberrantly expressed in a double transgenic mouse model for Alzheimer's disease targets TGF-beta type II receptor. *Brain research* **1357**, 166-174 (2010).

91. Li, Z., Yang, C.S., Nakashima, K. & Rana, T.M. Small RNA-mediated regulation of iPS cell generation. *The EMBO journal* **30**, 823-834 (2011).
92. Li, Q. & Verma, I.M. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nature reviews. Immunology* **2**, 725-734 (2002).
93. Gao, J., Zhu, Y., Nilsson, M. & Sundfeldt, K. TGF-beta isoforms induce EMT independent migration of ovarian cancer cells. *Cancer Cell Int* **14**, 72 (2014).
94. Ferrari, G., Cook, B.D., Terushkin, V., Pintucci, G. & Mignatti, P. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. *Journal of cellular physiology* **219**, 449-458 (2009).
95. Schagat, T.V., J. MicroRNA Biosensors:Application for the psiCHECKTM-2 Vector. *MICRORNA BIOSENSORS* **99**(2008).
96. Uefuji, K., Ichikura, T. & Mochizuki, H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **6**, 135-138 (2000).
97. Dubois, R.N., et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **12**, 1063-1073 (1998).
98. Xu, X., Huang, P., Yang, B., Wang, X. & Xia, J. Roles of CXCL5 on migration and invasion of liver cancer cells. *J Transl Med* **12**, 193 (2014).
99. Walz, A., Schmutz, P., Mueller, C. & Schnyder-Candrian, S. Regulation and function of the CXC chemokine ENA-78 in monocytes and its role in disease. *J Leukoc Biol* **62**, 604-611 (1997).
100. Kast, R.E., et al. Glioblastoma-synthesized G-CSF and GM-CSF contribute to growth and immunosuppression: Potential therapeutic benefit from dapsone, fenofibrate, and ribavirin. *Tumour Biol* **39**, 1010428317699797 (2017).
101. Tarassishin, L., Lim, J., Weatherly, D.B., Angeletti, R.H. & Lee, S.C. Interleukin-1-induced changes in the glioblastoma secretome suggest its role in tumor progression. *Journal of proteomics* **99**, 152-168 (2014).
102. McFarland, B.C., et al. NF-kappaB-induced IL-6 ensures STAT3 activation and tumor aggressiveness in glioblastoma. *PLoS one* **8**, e78728 (2013).
103. Wang, H., et al. Targeting interleukin 6 signaling suppresses glioma stem cell survival and tumor growth. *Stem cells* **27**, 2393-2404 (2009).
104. Raychaudhuri, B. & Vogelbaum, M.A. IL-8 is a mediator of NF-kappaB induced invasion by gliomas. *Journal of neuro-oncology* **101**, 227-235 (2011).
105. Albrengues, J., et al. LIF mediates proinvasive activation of stromal fibroblasts in cancer. *Cell reports* **7**, 1664-1678 (2014).

106. Penuelas, S., *et al.* TGF-beta increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma. *Cancer cell* **15**, 315-327 (2009).
107. Deuker, M.M. & McMahon, M. Cancer biology: Enzyme meets a surprise target. *Nature* **510**, 225-226 (2014).
108. Schmidt, C., *et al.* Mechanisms of proinflammatory cytokine-induced biphasic NF-kappaB activation. *Molecular cell* **12**, 1287-1300 (2003).
109. Corcoran, S.E. & O'Neill, L.A. HIF1alpha and metabolic reprogramming in inflammation. *The Journal of clinical investigation* **126**, 3699-3707 (2016).
110. Flamand, M.N., Gan, H.H., Mayya, V.K., Gunsalus, K.C. & Duchaine, T.F. A non-canonical site reveals the cooperative mechanisms of microRNA-mediated silencing. *Nucleic acids research* **45**, 7212-7225 (2017).
111. Vella, M.C., Choi, E.Y., Lin, S.Y., Reinert, K. & Slack, F.J. The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR. *Genes & development* **18**, 132-137 (2004).
112. Didiano, D. & Hobert, O. Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 849-851 (2006).
113. Triner, D. & Shah, Y.M. Hypoxia-inducible factors: a central link between inflammation and cancer. *The Journal of clinical investigation* **126**, 3689-3698 (2016).
114. Wang, L.Y., Tu, Y.F., Lin, Y.C. & Huang, C.C. CXCL5 signaling is a shared pathway of neuroinflammation and blood-brain barrier injury contributing to white matter injury in the immature brain. *Journal of neuroinflammation* **13**, 6 (2016).
115. Chen, C. COX-2's new role in inflammation. *Nat Chem Biol* **6**, 401-402 (2010).
116. Lee, J.J., *et al.* Hypoxia activates the cyclooxygenase-2-prostaglandin E synthase axis. *Carcinogenesis* **31**, 427-434 (2010).
117. Kesavan, K., *et al.* MEKK2 regulates the coordinate activation of ERK5 and JNK in response to FGF-2 in fibroblasts. *Journal of cellular physiology* **199**, 140-148 (2004).
118. Garrington, T.P., *et al.* MEKK2 gene disruption causes loss of cytokine production in response to IgE and c-Kit ligand stimulation of ES cell-derived mast cells. *The EMBO journal* **19**, 5387-5395 (2000).
119. Palazon, A., Goldrath, A.W., Nizet, V. & Johnson, R.S. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity* **41**, 518-528 (2014).
120. Grimson, A., *et al.* MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular cell* **27**, 91-105 (2007).
121. Patil, V., Pal, J. & Somasundaram, K. Elucidating the cancer-specific genetic alteration spectrum of glioblastoma derived cell lines from whole exome and RNA sequencing. *Oncotarget* **6**, 43452-43471 (2015).

122. Baskaran, S., *et al.* Primary glioblastoma cells for precision medicine: a quantitative portrait of genomic (in)stability during the first 30 passages. *Neuro-oncology* **20**, 1080-1091 (2018).
123. Lee, J., *et al.* Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer cell* **9**, 391-403 (2006).
124. Saeidnia, S., Manayi, A. & Abdollahi, M. From in vitro Experiments to in vivo and Clinical Studies; Pros and Cons. *Curr Drug Discov Technol* **12**, 218-224 (2015).
125. Mills, K.H. & Dunne, A. Immune modulation: IL-1, master mediator or initiator of inflammation. *Nature medicine* **15**, 1363-1364 (2009).
126. Dinarello, C.A., Simon, A. & van der Meer, J.W. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 633-652 (2012).
127. Yeung, Y.T., *et al.* p38 MAPK inhibitors attenuate pro-inflammatory cytokine production and the invasiveness of human U251 glioblastoma cells. *Journal of neuro-oncology* **109**, 35-44 (2012).
128. Bao, S., *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756-760 (2006).
129. Vescovi, A.L., Galli, R. & Reynolds, B.A. Brain tumour stem cells. *Nature reviews. Cancer* **6**, 425-436 (2006).
130. McCulloch, C.A., Downey, G.P. & El-Gabalawy, H. Signalling platforms that modulate the inflammatory response: new targets for drug development. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 864-876 (2006).
131. Wang, D. & Dubois, R.N. Eicosanoids and cancer. *Nature reviews. Cancer* **10**, 181-193 (2010).
132. Wang, D. & Dubois, R.N. Prostaglandins and cancer. *Gut* **55**, 115-122 (2006).
133. Greenhough, A., *et al.* The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* **30**, 377-386 (2009).
134. Loh, J.K., Hwang, S.L., Lieu, A.S., Huang, T.Y. & Howng, S.L. The alteration of prostaglandin E2 levels in patients with brain tumors before and after tumor removal. *Journal of neuro-oncology* **57**, 147-150 (2002).
135. Qiu, J., Shi, Z. & Jiang, J. Cyclooxygenase-2 in glioblastoma multiforme. *Drug Discov Today* **22**, 148-156 (2017).
136. Plate, K.H. & Mennel, H.D. Vascular morphology and angiogenesis in glial tumors. *Exp Toxicol Pathol* **47**, 89-94 (1995).
137. Brat, D.J., Castellano-Sanchez, A., Kaur, B. & Van Meir, E.G. Genetic and biologic progression in astrocytomas and their relation to angiogenic dysregulation. *Advances in anatomic pathology* **9**, 24-36 (2002).

138. Rolhion, C., *et al.* Interleukin-6 overexpression as a marker of malignancy in human gliomas. *Journal of neurosurgery* **94**, 97-101 (2001).
139. Dai, Z., *et al.* CXCL5 promotes the proliferation and migration of glioma cells in autocrine- and paracrine-dependent manners. *Oncology reports* **36**, 3303-3310 (2016).
140. Wang, J., *et al.* Granulocyte-colony stimulating factor promotes proliferation, migration and invasion in glioma cells. *Cancer Biol Ther* **13**, 389-400 (2012).
141. Tafani, M., *et al.* Pro-inflammatory gene expression in solid glioblastoma microenvironment and in hypoxic stem cells from human glioblastoma. *Journal of neuroinflammation* **8**, 32 (2011).
142. Pahl, H.L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**, 6853-6866 (1999).
143. Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. & Burge, C.B. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**, 787-798 (2003).

11 Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
BCA	Bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
COX2	Cyclooxygenase 2
Cp/ct	crossing point/cycle threshold (Schwellenwert)
CXCL5	C-X-C motif chemokine 5
ddH ₂ O	zweifach deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco´s modified eagle medium
DMOG	Dimethyloxalyglycine
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Deoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate (Deoxyribonukleosidtriphosphat)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
Engl.	Englisch
E. coli	Escherichia coli
et al.	et alii (und andere)
FCS	Fetal Calf Serum (fetales Kälberserum)
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
GBM	Glioblastoma Multiforme
gDNA	genomische DNA
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GSCs	glioma stem cells
HBSS	Hank's balanced salt solution
HIF-1 α	Hypoxia-inducible-factor-1 α
HEK-293	Human Embryonic Kidney Zellen
hluc+	Firefly Luciferase
HRE	hypoxia response element
hRluc	Renilla Luciferase
HRP	Horseradish Peroxidase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

IKK	I κ B α -Kinase-Komplex
IRAK4	Interleukin-1 Rezeptor assoziierten Kinase 4
kb	Kilobasen
LIF	Leukemia inhibitory factor
LPS	Lipopolysaccharid
MAP3K2	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2
MCM7	minichromosome maintenance complex component 7
MCS	Multiple Cloning Site
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
miR	microRNA
miRISC	miRNA-induced silencing complex
miRNA	microRNA
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
MMP-3	Matrix Metalloproteinase-3
NC	Negative Control (Negativkontrolle)
NEAA	Non-essential amino acids (nicht-essenzielle Aminosäuren)
NF- κ B	nuclear factor- κ B
nt	Nukleotid
ns	nicht signifikant
Oligo-(dT)	Oligo- Desoxythymidine
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen)
PBS	Phosphate Buffered Saline
RT-qPCR	Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
PGE2	Prostaglandin E2
pre-miR	precursor microRNA (Vorläufer-miRNA)
pri-miR	primary microRNA (primäre miRNA)
Psi Seq	psiCHECK TM -2 Sequenzierungsprimer
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
SDHA	Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein variant
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	Standard Error of the mean
siNC	siRNA Negativ Control
siRNA	Small interfering RNA
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
Taq	Thermus aquaticus

TBE	Tris-Borat-EDTA
TBP	TATA-binding protein
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
TGFBR2	Transforming Growth Factor Beta Receptor II
UPL	Universal ProbeLibrary
U87-MG	Humane Glioblastom Zellen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WC	Whole-cell extract (Gesamtzellextrakte)
WR	BCA Working Reagent
ZNS	Zentrales Nerven System
3'UTR	3'-untranslatierte Region
5'UTR	5'-untranslatierte Region

12 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der miRNA Biogenese	5
Abbildung 2: Beispielhafte Gelelektrophorese nach analytischem Restriktionsverdau	31
Abbildung 3: Aufbau des psiCHECK™-2 Vektors (Promega GmbH [95])	35
Abbildung 4: mRNA und Protein Expression inflammatorischer Gene nach Stimulation von GBM Zellen	46
Abbildung 5: Relative miR-93 Expression in Normalhirngewebe, GBM-Biopsaten und GBM Zelllinien	47
Abbildung 6: U87 Transfektionseffizienz nach 24 und 48 Stunden	48
Abbildung 7: MicroArray Analyse von miR-93/ NC transfizierten und IL-1 β stimulierten U87 Zellen.	49
Abbildung 8: miR-93 Transfektion reduziert inflammatorische Genexpression und Zytokinsekretion in GBM Zelllinien	51
Abbildung 9: miR-93 Transfektion reduziert inflammatorische Genexpression auch bei maximaler inflammatorischer Stimulation durch Hypoxie und IL-1 β	52
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Dual Luciferase Assays	54
Abbildung 11: Target Validierung identifiziert LIF, G-CSF, IL-6, Map3K2 und HIF-1 α erstmalig als direkte miR-93 Zielgene; Herunterregulation von COX2 und CXCL5 vermittelt durch die direkten Zielgene HIF-1 α und Map3K2	55
Abbildung 12: miR-93 Bindestellen im Map3K2 3'UTR	56
Abbildung 13: DNA Sequenzierungsanalyse der Map3K2 3'UTR Mutagenese.....	59
Abbildung 14: Sequentielle Mutagenese des Map3K2 3'UTRs in HEK293.....	59
Abbildung 15: miR-93 Bindestelle im HIF-1 α 3'UTR.....	60
Abbildung 16: Sequentielle Mutagenese des HIF-1 α 3'UTRs.....	61
Abbildung 17: Funktionelle Relevanz der miR-93 im Hinblick auf zentrale Tumoreigenschaften; a) Verringerung der Migration und b) Reduktion des angiogenetischen Potenzials.....	62

13 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reagenzien.....	11
Tabelle 2: Kits und Assays.....	13
Tabelle 3: Medien und Puffer	14
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien.....	16
Tabelle 5: Geräte	17
Tabelle 6: Oligonukleotide	19
Tabelle 7: Restriktionsendonukleasen.....	19
Tabelle 8: Zelllinien	20
Tabelle 9: Elektroporationsparameter.....	23
Tabelle 10: Übersicht verschiedener Transfektionsmethoden.....	24
Tabelle 11: Mastermix Transfektion	24
Tabelle 12: Mastermix Reverse Transkription RNAqueous	27
Tabelle 13: Mastermix Reverse Transkription <i>mirVana</i>.....	28
Tabelle 14: Anforderungen an die Proben zur Microarray Analyse bei IMG M Laboratories GmbH	30
Tabelle 15: Darstellung relevanter inflammatorischer Gene im GBM.....	44

14 Danksagung

Die vorliegende Dissertation hätte ohne fachliche, kollegiale und freundschaftliche Unterstützung nicht in diesem Maße umgesetzt werden können.

Aus diesem Grund möchte ich mich besonders bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Dr. S. Kreth und meinem Betreuer Max Hübner für die herausragende Zusammenarbeit, die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und Geduld bedanken. Besonders die enthusiastische und begeisternde Vermittlung experimenteller, molekularbiologischer Forschungsinhalte hat mir zu besonders großem Spaß an dieser Arbeit verholfen.

Ein großes Dankeschön gilt Herrn Prof. Dr. B. Zwißler, der mir diese Dissertation in dem anaesthesiologischen Forschungslabor ermöglicht hat.

Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. F.-W. Kreth und der Klinik für Neurochirurgie für die Bereitstellung neurochirurgischer Gewebepreparate.

Vielen Dank an Frau Gabriele Gröger, Gudrun Prangenberg, Jessica Rink und allen anderen Kollegen aus dem Labor für die fachlichen Hilfestellungen und besonders für die angenehm freundliche, lockere und persönliche Arbeitsatmosphäre.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Freunden und meiner Familie ein großes Dankeschön aussprechen, auf deren Rat ich mich immer verlassen konnte und die mir immer zur Seite standen.