

Neue Aspekte der Adhäsion und Migration von Meningeomzellen und ihre therapeutische Nutzbarkeit

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von **Dipl.-Neurowiss. Nadine Kliese**

geb. am 06.03.1984 in Magdeburg

Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Mawrin
Prof. Dr. rer. nat. Uwe Lendeckel

eingereicht am: 23.02.2018

verteidigt am: 19.12.2018

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis..... | I |
| Tabellenverzeichnis..... | VI |
| Zusammenfassung..... | VII |
| Abstract..... | IX |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Meningeome..... | 1 |
| 1.1.1 Häufigkeit, Geschlechtsdimorphismus und denkbare Ursachen..... | 1 |
| 1.1.2 Histologische Klassifikation..... | 3 |
| 1.1.3 Inaktivierung von NF2 als häufigste molekulare Alteration in Meningeomen..... | 4 |
| 1.1.4 Migrationstypen..... | 4 |
| 1.1.5 Therapie..... | 7 |
| 1.1.6 Integrine..... | 8 |
| 1.1.7 Micro-RNA..... | 9 |
| 1.2 Ziele..... | 11 |
| 2 Materialien..... | 12 |
| 2.1 Zelllinien..... | 12 |
| 2.2 Tumormaterial..... | 13 |
| 2.3 Primer..... | 13 |
| 2.3.1 Primer Sequenzierung..... | 13 |
| 2.3.2 Primer cDNA-Synthese..... | 13 |
| 2.3.3 Real-Time PCR Primer..... | 14 |
| 2.4 LOH-Analyse..... | 15 |
| 2.5 Enzyme..... | 16 |
| 2.6 Antikörper..... | 16 |
| 2.7 Kits und Fertiglösungen..... | 17 |
| 2.8 Lösungen und Puffer..... | 18 |
| 2.9 SDS-Polyacrylamidgele für Gelelektrophorese..... | 20 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.10 | Bakterienstamm | 20 |
| 2.11 | Plasmide | 20 |
| 2.12 | Chemikalien | 21 |
| 2.13 | Verbrauchsmaterialien | 26 |
| 2.14 | Geräte | 27 |
| 3 | Methoden | 30 |
| 3.1 | Zelllinien | 30 |
| 3.2 | Kultivierung der humanen Meningeom-Zelllinien | 30 |
| 3.3 | Kryokonservierung und Rekultivierung der Zelllinien..... | 31 |
| 3.4 | RNA-Isolierung mit Trizol | 31 |
| 3.4.1 | <i>RNA-Isolierung aus Gewebe</i> | <i>31</i> |
| 3.4.2 | <i>RNA-Isolierung aus adhärennten Zellen</i> | <i>32</i> |
| 3.5 | Reverse Transkription (cDNA-Synthese) | 33 |
| 3.6 | Real-Time PCR | 33 |
| 3.7 | Real-Time PCR mit dem mirVana™ qRT-PCR miRNA Detection Kit..... | 35 |
| 3.8 | RT ² Profiler™ PCR Array System | 36 |
| 3.9 | Sequenzierung | 37 |
| 3.10 | LOH-Analyse (Loss of Heterozygosity, chromosomale Stückverluste)..... | 37 |
| 3.11 | Pre-miR-145 Transfektion von IOMM-Zellen | 38 |
| 3.12 | Kultivierung von E. coli | 39 |
| 3.13 | Lagerung von Bakterienkulturen..... | 39 |
| 3.14 | Transformation von E. coli..... | 39 |
| 3.15 | Plasmid-Präparation..... | 40 |
| 3.16 | Transfektion von Meningeom-Zelllinie mit shRNA Plasmiden | 40 |
| 3.17 | Proteinisolierung | 40 |
| 3.17.1 | <i>Proteinisolierung aus Kryogewebe</i> | <i>41</i> |
| 3.17.2 | <i>Proteinisolierung aus Zellkulturen</i> | <i>41</i> |
| 3.17.3 | <i>Proteinbestimmung</i> | <i>41</i> |
| 3.18 | Western Blot..... | 42 |
| 3.19 | Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 42 |
| 3.20 | Proteintransfer | 43 |
| 3.21 | Immunologischer Nachweis | 43 |
| 3.22 | Stripping und Wiederverwendung der Nitrocellulosemembran..... | 44 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.23 | Präparation und Kultivierung organotypischer und hippokampaler Schnittkulturen | 44 |
| 3.24 | OHC-Beobachtung mit Zwei-Photonen-Mikroskop..... | 45 |
| 3.25 | Mausmodelle..... | 46 |
| 3.25.1 | <i>Subkutane Tumorinjektion in Nacktmäusen.....</i> | 46 |
| 3.25.2 | <i>Intrakranielle Tumorapplikation in Nacktmäusen.....</i> | 47 |
| 3.25.3 | <i>Behandlung der Nacktmäuse mit Cilengitide.....</i> | 49 |
| 3.25.4 | <i>Magnetresonanztomographie (MRT) des intrakraniellen Tumorwachstums</i> | 50 |
| 3.25.5 | <i>Dekapitation der Nacktmäuse und Präparation der Tumorgewebe mit anschließender Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung).....</i> | 50 |
| 3.25.6 | <i>Histochemische H&E-Färbungen und Immunhistochemie.....</i> | 51 |
| 3.25.7 | <i>Zwei-Photonen-Mikroskop in vivo.....</i> | 52 |
| 3.26 | Statistik..... | 53 |
| 4 | Ergebnisse..... | 55 |
| 4.1 | Verminderte <i>miR-145</i> -Expression in hochgradigen Meningeomen als Hinweis auf eine Tumorsuppressorfunktion | 55 |
| 4.2 | Rekonstitution der <i>miR-145</i> -Expression in malignen Meningeomzellen zur Analyse der Wirkungen dieser miRNA..... | 61 |
| 4.3 | <i>MiR-145</i> wirkt als moderater Tumorsuppressor <i>in vivo</i> | 64 |
| 4.4 | Einfluss von <i>miR-145</i> auf die Tumorzellmigration <i>in vivo</i> und an hippokampalen Schnittkulturen | 67 |
| 4.5 | Durch <i>miR-145</i> regulierte Motilitäts-assoziierte Gene | 71 |
| 4.6 | Therapieversuche <i>in vivo</i> mit Angriffspunkt an der Tumorzellmigration | 79 |
| 5 | Diskussion | 87 |
| 5.1 | Die micro-RNA-145 | 87 |
| 5.1.1 | <i>Tumorsuppressorfunktion der miR-145.....</i> | 87 |
| 5.1.2 | <i>MiR-145 als potenzieller Prognosefaktor beim Meningeom.....</i> | 91 |
| 5.1.3 | <i>Mögliche Ursachen des miR-145-Verlusts.....</i> | 91 |
| 5.2 | Mögliche durch <i>miR-145</i> regulierte Motilitäts-assoziierte Gene..... | 95 |
| 5.3 | Therapieversuche <i>in vivo</i> mit Cilengitide | 97 |
| 5.3.1 | <i>Integrin $\alpha\beta5$ und $\alpha\beta3$ Expression in Meningeomen.....</i> | 98 |

| | | |
|-------|--|------------|
| 5.3.2 | <i>Hemmung der Hirninvasion</i> | 99 |
| 5.4 | Ausblick..... | 101 |
| 6 | Anhang | 103 |
| 7 | Literatur | 105 |
| | Eidesstattliche Erklärung | 117 |
| | Publikationsliste | 118 |

Abkürzungsverzeichnis

| | | |
|----------------|---|--|
| AAV | - | Adeno-assoziiertes Virus |
| AKT-1 | - | Proteinkinase B α |
| APS | - | Ammoniumpersulfat |
| ATCC | - | American Type Culture Collection |
| AUC | - | area under curve |
| β 2-MG | - | β 2-Mikroglobulin |
| BSA | - | Bovines Serumalbumin |
| CBTRUS | - | Central Brain Tumor Registry of the United States |
| CCAAT | - | Cytosin-Cytosin-Adenin-Adenin-Thymin |
| Cdc42 | - | Cell division control protein 42 homolog |
| cDNA | - | Komplementäre DNA |
| C/EBP- β | - | CCAAT/Enhancer-Binding-Protein- β |
| COL5A1 | - | Kollagen Typ 5 |
| DAB+ | - | Diaminobenzidin |
| DEPC | - | Diethylpyrocarbonat |
| DKFZ | - | Deutsches Krebsforschungszentrum |
| DMEM | - | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DNA | - | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTPs | - | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| DSMZ | - | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| DTT | - | Dithiothreitol |
| DZNE | - | Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen |
| ECL | - | Enhanced chemiluminescence |
| EDTA | - | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | - | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| ERM | - | Ezrin, Radixin, Moesin |
| EZM | - | Extrazellulären Matrix |
| FACS | - | fluorescence-activated cell sorting |
| FSCN1 | - | Fascin |
| FBS | - | Fetales Kälberserum |
| GAPDH | - | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |

| | | |
|----------------|---|--|
| GFP | - | Grün fluoreszierendes Protein |
| GTP | - | Guanosintriphosphat |
| HEK | - | Human Embryonic Kidney |
| HPF | - | high-power fields |
| HPLC | - | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| HRP | - | Meerrettichperoxidase |
| KLF4 | - | Krüppel-like factor 4 |
| LB | - | Lysogeny broth |
| LOH | - | Loss of Heterozygosity |
| MAT | - | Mesenchymale-amöboide Transition |
| MAPK | - | Mitogen-activated protein kinase |
| MDS | - | Myelodysplastisches Syndrom |
| MGMT | - | O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase |
| miRNA | - | microRNA |
| miR-145 | - | miR-145 microRNA |
| MMP | - | Matrix-Metalloproteinasen |
| mRNA | - | messenger RNA |
| mTOR | - | mechanistic target of rapamycin |
| n | - | Anzahl |
| NF2 | - | Neurofibromatose Typ 2 |
| NPCR | - | National Program of Cancer Registries |
| nt | - | Nukleotide |
| OHC | - | organotypische hippokampale Schnittkultur |
| PBS | - | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PBS-T | - | PBS-Tween-Puffer |
| PCR | - | Polymerase-Kettenreaktion |
| PDGFR- β | - | Platelet-derived growth factor receptors- β |
| PI3K | - | Phosphoinositid-3-Kinase |
| qRT-PCR | - | Real-Time quantitative PCR |
| Rac | - | Ras-related C3 botulinum toxin substrate |
| RGD | - | Tripeptid-Sequenz aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure |
| Rho | - | Ras homologue |
| RIPA | - | Radioimmunoprecipitation assay |

| | | |
|----------|---|--|
| RNA | - | Ribonukleinsäure |
| ROCK-1 | - | Rho-associated protein kinase-1 |
| rRNA | - | ribosomale RNA |
| SD | - | standard deviation |
| SDS | - | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | - | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| SEER | - | Surveillance, Epidemiology and End Results |
| SEM | - | standard error of the mean |
| shRNA | - | small hairpin RNA |
| SMO | - | smoothened, frizzled class receptor |
| SPARC | - | secreted protein acidic and rich in cysteine |
| TBS | - | Tris-buffered saline |
| TEMED | - | Tetramethylethyldiamin |
| TERT | - | Telomerase reverse transcriptase |
| THBS | - | Thrombospondin |
| TMA | - | Tissue Microarray |
| TRAF-7 | - | TNF receptor associated factor-7 |
| TRIS | - | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| WHO | - | World Health Organization |
| ZNS | - | Zentrales Nervensystem |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---------------|--|----|
| Abbildung 1: | Verteilung der vorgekommenen primären Hirntumoren und ZNS-Tumoren (N = 356.858), CBTRUS Statistical Report: NPCR and SEER, 2008-2012. | 2 |
| Abbildung 2: | a - Meningotheliales Meningeom mit kubischen Zellen; b - Fibroblastisches Meningeom mit elongierten Zellen (Mawrin and Perry 2010). | 6 |
| Abbildung 3: | Differentielle Expression der <i>miR-145</i> zwischen den einzelnen Tumorgaden. | 55 |
| Abbildung 4: | LOH-Analyse im <i>miR-145</i> -Locus; WHO-Grad I. | 56 |
| Abbildung 5: | LOH-Analyse im <i>miR-145</i> -Locus; WHO-Grad II. | 57 |
| Abbildung 6: | LOH-Analyse im <i>miR-145</i> -Locus; WHO-Grad III. | 58 |
| Abbildung 7: | C/EBP- β -mRNA in Meningeomen. | 58 |
| Abbildung 8: | C/EBP- β -Protein in Meningeomen. | 59 |
| Abbildung 9: | Phosphorylierung von C/EBP- β -Protein in Meningeomen. | 60 |
| Abbildung 10: | <i>NF2</i> -mRNA in Meningeomen. | 61 |
| Abbildung 11: | a - Wirksamkeit der transienten pre-miR-145-Transfektion. b - Wirksamkeit der stabilen <i>miR-145</i> -Transduktion. | 62 |
| Abbildung 12: | a - Wirkung der transienten pre-miR-145-Transfektion auf <i>NF2</i> -mRNA. b - Wirkung der stabilen <i>miR-145</i> -Transduktion auf <i>NF2</i> -mRNA. | 63 |
| Abbildung 13: | Wirkung der stabilen <i>miR-145</i> -Transduktion auf das NF2-Protein. | 64 |
| Abbildung 14: | Einfluss von <i>miR-145</i> auf Tumolvolumenkurve (subkutan). | 64 |
| Abbildung 15: | Einfluss von <i>miR-145</i> auf Tumolvolumenkurve (orthotop). | 65 |
| Abbildung 16: | MRT-Aufnahmen, axiale Schnittebene. | 66 |
| Abbildung 17: | Histologische Analyse des subarachnoidalen Tumorwachstums in der Maus. | 67 |
| Abbildung 18: | a - Versuchsaufbau für Zwei-Photonen-Mikroskopie mit Nacktmaus; b - Filmausschnitte 1 Tag nach der Tumorzellapplikation (Maßstabsbalken entspricht 20 μ m). | 68 |
| Abbildung 19: | 3D Rekonstruktion des Tumorzellverbands (Maßstabsbalken entspricht 80 μ m). | 70 |
| Abbildung 20: | IOMM-miR-145 und IOMM-miRKO Zellen 24 bzw. 48 Stunden auf OHC kultiviert. | 71 |
| Abbildung 21: | Relative Expressionsänderung Array. | 72 |
| Abbildung 22: | <i>COL5A1</i> Expression in Meningeomen. | 73 |
| Abbildung 23: | Streudiagramm und Pearson-Korrelationskoeffizient zwischen der relativen <i>miR-145</i> und <i>COL5A1</i> Expression (gleiche Serie humaner Meningeome). | 74 |
| Abbildung 24: | Darstellung der immunhistochemischen Färbung eines Gewebe-Mikroarrays mit <i>COL5A1</i> | 75 |
| Abbildung 25: | <i>COL5A1</i> im Spektrum von unterschiedlichen Zelllinien. | 76 |
| Abbildung 26: | Technische Kontrolle stabiler <i>COL5A1</i> -sh-Transfektion. | 77 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 27: Effektivität der sh-Transfektion per Western Blot am Tag 8 und am Tag 12 nach der Infektion. | 77 |
| Abbildung 28: <i>FSCN1</i> -mRNA nach stabiler <i>miR-145</i> -Transduktion. | 78 |
| Abbildung 29: <i>FSCN1</i> -Protein nach stabiler <i>miR-145</i> -Transduktion. | 78 |
| Abbildung 30: <i>FSCN1</i> -mRNA in Meningeomen..... | 79 |
| Abbildung 31: Darstellung der immunhistochemischen Färbung eines Gewebe-Mikroarrays mit Integrin $\alpha\beta 5$ (a, b, c) und $\alpha\beta 3$ (d)..... | 81 |
| Abbildung 32: Schätzung des Tumolvolumens des orthotopen Mausmodells mit IOMM-Lee Zellen. | 82 |
| Abbildung 33: Schätzung des Tumolvolumens des orthotopen Mausmodells mit IOMM-Lee Zellen. | 83 |
| Abbildung 34: Überlebenszeitversuch. | 84 |
| Abbildung 35: Kaplan-Meier-Methode zur Überlebenszeitanalyse..... | 84 |
| Abbildung 36: Histologische Analyse der Tiere für den Überlebenszeitversuch. | 85 |
| Abbildung 37: Tumolvolumen des orthotopen Mausmodells mit KT21-MG1 Zellen. | 86 |
| Abbildung 38: Vektorkarte LVRH1GP (GeneCopoeia, Rockville, MD, USA). | 103 |
| Abbildung 39: Vektorkarte psPAX2 (Addgene, Cambridge, MA, USA). | 103 |
| Abbildung 40: Vektorkarte pMD2.G (Addgene, Cambridge, MA, USA)..... | 104 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-------------|--|----|
| Tabelle 1: | Meningeomsubtypen und Abstufungen gemäß der WHO-Klassifikation von Hirntumoren (Mawrin and Perry 2010) | 3 |
| Tabelle 2: | Zelllinien..... | 12 |
| Tabelle 3: | Primer für die Sequenzierung | 13 |
| Tabelle 4: | Primer für die cDNA-Synthese..... | 13 |
| Tabelle 5: | Real-Time PCR Primer | 14 |
| Tabelle 6: | Mikrosatelliten..... | 15 |
| Tabelle 7: | Enzyme | 16 |
| Tabelle 8: | Primärantikörper | 16 |
| Tabelle 9: | Sekundärantikörper..... | 16 |
| Tabelle 10: | Monoklonale Antikörper | 17 |
| Tabelle 11: | Kits und Fertiglösungen | 17 |
| Tabelle 12: | Lösungen und Puffer..... | 18 |
| Tabelle 13: | SDS-Polyacrylamidgele für Gelelektrophorese | 20 |
| Tabelle 14: | Bakterienstamm | 20 |
| Tabelle 15: | Plasmide | 20 |
| Tabelle 16: | Chemikalien | 21 |
| Tabelle 17: | Verbrauchsmaterialien..... | 26 |
| Tabelle 18: | Geräte | 27 |
| Tabelle 19: | Bedingungen Real-Time PCR | 34 |
| Tabelle 20: | Bedingungen Real-Time PCR mirVana | 35 |
| Tabelle 21: | Bedingungen Real-Time PCR RT ² Profiler™ PCR Array | 36 |
| Tabelle 22: | Übersicht der Versuchstiere für die subkutane Tumordinjektion | 47 |
| Tabelle 23: | Intrakranielle Tumorapplikation..... | 48 |
| Tabelle 24: | Immunhistochemische Färbung von humanen Meningeomen unterschiedlicher Malignität mit $\alpha\beta 5$ | 81 |
| Tabelle 25: | Vergleich des Invasionsgrads der Kontrolltiere und der mit Cilengitide behandelten Tiere für den Überlebenszeitversuch ohne zusätzliche Bestrahlung..... | 85 |

Zusammenfassung

Meningeome sind die häufigsten intrakraniellen oder intraspinalen Tumoren des Menschen. Obwohl sie in der überwiegenden Mehrheit als langsam wachsende benigne Tumoren vorkommen und dem WHO-Grad I zuzuordnen sind (~80%), gehört ein Prozentsatz von 15-20% zu den atypischen (WHO-Grad II) und 2-3% zu den anaplastischen Formen (WHO-Grad III) mit schlechterer Prognose, aggressiverem Wachstumsverhalten und höheren Rezidivraten.

Ein Schwerpunkt dieser Dissertation war darauf ausgerichtet, neue mit Adhäsion und Migration assoziierte Mechanismen und Moleküle zu entdecken, die differentiell zwischen Meningeomen der WHO-Grade II bzw. III und solchen des WHO-Grades I exprimiert sind. Eine vielversprechende Kandidaten-miRNA, die *miR-145*, welche die Bedingungen zu erfüllen schien, wurde genauer untersucht. Es konnte anhand einer Tumorserie gezeigt werden, dass *miR-145* nicht nur generell in Meningeomen verloren geht, sondern vor allem in den atypischen und malignen Tumoren signifikant vermindert ist, im Vergleich zu den benignen Tumoren. Des Weiteren wurde an einem orthotopen, d. h. besonders realitätsnahen Xenograft-Modell der Maus mithilfe von MRT-Messungen nachgewiesen, dass die Rekonstitution der in diesen aggressiven Meningeomzellen verloren gegangenen *miR-145* zu einem signifikant gehemmten Tumorwachstum im Schädel führte mit $p \leq 0,01$ (0,05) an Tag 7 (14) nach Inokulation. Damit wurde auch *in vivo* der Tumorsuppressor-Charakter nachgewiesen. Bei Xenografts mit rekonstituierter *miR-145* erschien die zapfenförmige Hirninvansion im histologischen Bild vermindert.

Als Nächstes kam der Identifizierung von Genen eine wichtige Bedeutung zu, die durch *miR-145* reguliert sind und eine Rolle bei der Zelladhäsion spielen, der Wechselwirkung zwischen Meningeomzelle und extrazellulärer Matrix sowie deren Motilität. Im direkten Vergleich syngener maligner Meningeomzellen mit hoher bzw. niedriger *miR-145* Expression zeigten sich nur wenige solcher Gene differentiell reguliert, am stärksten *COL5A1* (Kollagen Typ 5). Mit ihm wurde ein potentiell Kandidaten-Gen in der vorliegenden Arbeit gefunden, dessen erhöhte Expression in Zellen mit *miR-145*-Verlust Tumorzellmotilität fördern könnte. Seine mRNA verhielt sich in humanen Meningeomproben umgekehrt zu *miR-145*. *COL5A1* ist als

Katalysator der Kollagen-Fibrillenbildung auch mit für die Motilität von Zellen in kollagenhaltigen Matrizen wesentlich. Direkte Versuche zur therapeutischen Beeinflussung der Zellmotilität über das Pentapeptid Cilengitide mit und ohne Kopfbestrahlung ergaben keine signifikante Überlebenszeit-Verlängerung im orthotopen Mausmodell durch die Substanz. Es gab nur einen Effekt durch die Bestrahlung ($p \leq 0,001$ im Log-Rang-Test).

Abstract

Meningiomas are among the most frequent intracerebral or intraspinal tumors in humans. While the vast majority (80%) corresponds to benign tumors of WHO grade I, 15-20% belong to atypical tumors of WHO grade II and 2-3% to anaplastic forms of grade III, both with worse prognosis and exhibiting a more aggressive tumor growth with higher recurrence rates.

A focus of the presented PhD thesis was to search for new molecules and mechanisms associated with adhesion and migration, which may be differentially expressed between meningiomas of WHO grades II and III on one side, versus grade I on the other. A promising candidate miRNA, i.e. *miR-145*, which seemed to fulfill these criteria, was analyzed in more detail. In a human tumor series it could be shown that *miR-145* was not only generally reduced in meningiomas, but -most importantly- was reduced in grades II and III as compared to grade I. Using an orthotopic and thereby most representative mouse xenograft model, it was further shown that the reconstitution of *miR-145* in the xenografted meningioma cells led to a significant suppression of intracranial tumor growth, as visualized by MRI with $p \leq 0.01$ (0.05) on days 7 (14) after tumor inoculation. These experiments supported *in vivo* the character of *miR-145* as a tumor suppressor. Xenografts with reconstituted *miR-145* also exhibited a lower degree of tongue-like brain invasion, as visualized by histology.

An important aspect was the identification of downstream-targets of *miR-145*, which may play a role in cell adhesion, in the interaction between meningioma cells and extracellular matrix or in motility. In a direct comparison between syngeneic meningioma cells with high or low *miR-145* level only a few differentially expressed genes of the aforementioned type were found. The strongest fold-change showed *COL5A1* (collagen type 5). This gene represented a potential candidate, the enhanced expression of which in *miR-145* deficient meningioma cells may trigger enhanced motility. Its mRNA levels were inverse to *miR-145* in human meningioma samples. *COL5A1* is essential for the nucleation of collagen fibrillogenesis and thus a factor with an impact on cell motility in matrices containing collagen. Experiments trying to directly inhibit motility by the pentapeptide cilengitide with or without total

brain irradiation did not result in a significantly prolonged survival in the orthotopic mouse model by the drug, but showed solely an effect of irradiation ($p \leq 0.001$ in log-rank).

1 Einleitung

1.1 Meningeome

Meningeome sind verbreitete Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS), welche aus entarteten Zellen der Meningen (Hirnhäute) entstehen, die wiederum das Gehirn und Rückenmark umgeben. Die arachnoidalen Deckzellen sind den Tumorzellen der Meningeome zytologisch sehr ähnlich und werden deswegen als Ausgangszellen angenommen. Meningeome und nicht-neoplastische meningotheleiale Zellen sind morphologisch, ultrastrukturell und funktionell mit ihren mesenchymalen und epithelialen Eigenschaften einzigartig (Perry et al. 2004).

1.1.1 Häufigkeit, Geschlechtsdimorphismus und denkbare Ursachen

Meningeome sind die häufigsten intrakraniellen oder spinalen Tumoren des Menschen (Mawrin and Perry 2010; Wilisch-Neumann et al. 2013; Preusser et al. 2018). Die Inzidenzrate zwischen Frauen und Männern ist signifikant verschieden. Bei Frauen treten sowohl häufiger nicht maligne ($p \leq 0,001$) als auch maligne ($p = 0,003$) Meningeome auf (Ostrom et al. 2015). Insgesamt sind Frauen etwa doppelt so häufig von einem Meningeom betroffen wie Männer, weshalb sogar über den Einfluss von Östrogenen wie beim Mammakarzinom oder zumindest generell von Geschlechtshormonen nachgedacht wird (Wahab and Al-Azzawi 2003). Dieser Verdacht wurde im Jahre 2016 durch umfangreiche epidemiologische Daten stark untermauert, die eine Senkung des Risikos zur Entwicklung dieser Tumoren durch Tamoxifen nachwiesen (Ji et al. 2016), somit durch einen in der Therapie des Mammakarzinoms etablierten Östrogenrezeptor-Modulators (Jordan 2014). Außer im Zusammenhang der Neurofibromatose Typ 2 (Schroeder et al. 2014) treten Meningeome gewöhnlich als sporadische Tumoren auf. Die Auslöser dieser nicht-erblichen Formen bzw. die sie favorisierenden Lebensumstände sind weitgehend unbekannt. Außer der Rolle von Geschlechtshormonen ist in den letzten Jahren vor allem der Bezug des Erkrankungsrisikos zu pathologischen Stoffwechsellagen bzw. zu pathologisch veränderten Hormonlagen bemerkt und diskutiert worden. So gibt es durch den positiven Zusammenhang zwischen Adipositas und Meningeomrisiko (Niedermaier et al. 2015) eine Diskussion über einen potentiellen Einfluss von Fett hormonen (Adipokinen), vor allem von Adiponektin und Leptin (Dalamaga et al.

2012; Niu et al. 2013). Alternativ wäre trotz widersprüchlicher Befunde ebenso eine Rolle der mit Adipositas vergesellschafteten prädiabetischen oder diabetischen Stoffwechsellage denkbar (Bernardo et al. 2016). Meningeome treten oft im Erwachsenenalter auf und die Inzidenzrate steigt mit zunehmendem Alter (Ostrom et al. 2015). Meningeome sind im Kindesalter selten. Sie haben einen Anteil von nur 0,4 - 4,1% bei den Tumoren im Kindesalter und einen Anteil von lediglich 1,5 - 1,8% bei sämtlichen intrakraniellen Meningeomen (Tufan et al. 2005).

In der Abbildung 1 ist eine Verteilung der malignen (bösartigen) und nicht malignen primären Hirntumoren und ZNS-Tumoren, bzw. intrakraniellen Tumoren dargestellt. Der größte Teil der Meningeome ist nicht maligne.

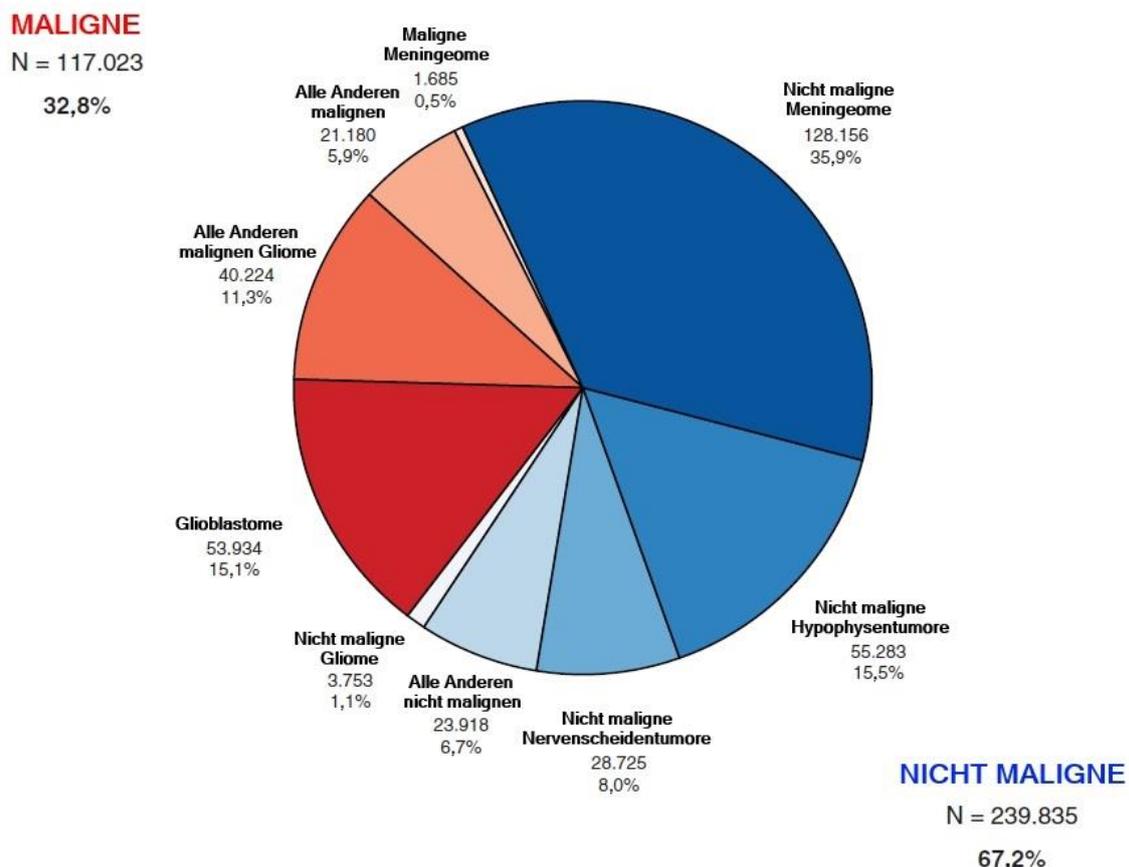


Abbildung 1: Verteilung der vorgekommenen primären Hirntumoren und ZNS-Tumoren (N = 356.858), CBTRUS Statistical Report: NPCR and SEER, 2008-2012.

1.1.2 *Histologische Klassifikation*

Die Mehrheit der auftretenden Meningeome ist benigne (gutartig), dennoch haben sie ein breites Spektrum an klinischen Merkmalen und sind mit dem hohen Risiko des erneuten Auftretens (Rezidiv) behaftet, selbst nach der scheinbar kompletten Resektion (Mawrin et al. 2005).

Die aktuelle Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (kurz WHO - World Health Organization) hat 16 verschiedene Varianten oder Subtypen der Meningeome aufgelistet, welche in WHO-Grad I, II oder III unterschieden werden (vgl. Tabelle 1). Unter WHO-Grad I sind die langsam wachsenden benignen Tumoren zusammengefasst (~80%), diese sind weder hirninvasiv noch erfüllen sie Kriterien für atypische (15-20%) oder anaplastische (2-3%) Tumoren, welche ein aggressiveres Wachstumsverhalten und höhere Rezidivraten aufweisen. Die atypischen Tumoren werden dem WHO-Grad II zugeordnet und besitzen eine erhöhte mitotische Aktivität [4 oder mehr Mitosen auf 10 Gesichtsfelder im 40er Objektiv (HPF - high-power fields)] und/ oder drei oder mehr der folgenden Eigenschaften: flächenförmiges Wachstum, spontane Nekrosen, vorstehende Kernkörperchen, erhöhte Zelldichte, kleine Zellen mit hoher Kern-Plasma-Relation. Meningeome, die als WHO-Grad III eingestuft werden, sind hauptsächlich anaplastische (maligne) Tumoren. Sie weisen erhöhte mitotische Aktivität auf (20 oder mehr Mitosen auf 10 HPF) oder das Vorhandensein einer Anaplasie mit melanom-, sarkom-, oder karzinomähnlicher Histologie (Mawrin and Perry 2010).

Tabelle 1: Meningeomsubtypen und Abstufungen gemäß der WHO-Klassifikation von Hirntumoren (Mawrin and Perry 2010)

| | WHO-Grad I | WHO-Grad II | WHO-Grad III |
|--|-----------------------|-------------|--------------|
| Histologischer Meningeom-subtyp | Meningothelial | Chordoid | Papillär |
| | Fibroblastisch | Klarzellig | Rhabdoid |
| | Transitional | Atypisch | Anaplastisch |
| | Psammomatös | Hirninvasiv | |
| | Angiomatös | | |
| | Mikrozystisch | | |
| | Sekretorisch | | |
| | Lymphoplasmazellreich | | |
| | Metaplastisch | | |

1.1.3 *Inaktivierung von NF2 als häufigste molekulare Alteration in Meningeomen*

In etwa der Hälfte der Meningeome wurde der Verlust eines Chromosoms 22 (Zankl and Zang 1972; Zang 1982) oder eine partielle Deletion des langen Arms entdeckt, es traten Allelverluste (LOH) auf 22q auf (Seizinger et al. 1986). Mithilfe von Kopplungsstudien wurde auf dem Chromosom 22 das Tumorsuppressorgen *NF2* lokalisiert (Rouleau et al. 1987). *NF2* steht für Neurofibromatose Typ 2 und ist eine hereditäre Tumorerkrankung des ZNS mit einer Inzidenz von 1 in 33000 bis 40000, dabei handelt es sich u.a. um Schwannome, Meningeome, Gliome und Neurofibrome (Evans et al. 1992). Bei Frauen mit Neurofibromatose Typ 2 treten signifikant mehr Meningeome als bei Männern auf (Evans et al. 1995). Das Proteinprodukt des *NF2*-Gens wird Merlin (ältere Bezeichnung Schwannomin) genannt und gehört zu der Familie der 4.1-Proteine. Der Begriff Merlin (moesin-ezrin-radixin-like protein) setzt sich aus den nächsten Verwandten, der ERM-Proteine (Ezrin, Radixin, Moesin), zusammen (Turunen et al. 1998; Obremski et al. 1998; Grönholm et al. 1999). Merlin wirkt u. a. bei Proliferation, Migration und einer von Zell-Zell-Kontakten abhängigen Repression der Signaltransduktion von Rezeptortyrosinkinasen mit (McClatchey and Giovannini 2005; Curto et al. 2007; Curto and McClatchey 2008). Ein nur somatischer Funktionsverlust dieses bei Neurofibromatose Typ 2 in der Keimbahn mutierten Tumorsuppressors spielt demnach offensichtlich eine wesentliche, wenngleich nicht zwingende Rolle bei der Genese sporadischer Meningeome. In kleinen Prozentsätzen der nicht im *NF2*-Gen mutierten Tumoren wurden in den letzten Jahren onkogene Missense-Mutationen einiger anderer Gene gefunden, wie *SMO*, *KLF4*, *TRAF-7*, *AKT-1* oder *PI3K* (Brastianos et al. 2013; Clark et al. 2013; Sahm et al. 2013; Abedalthagafi et al. 2016; Preusser et al. 2018).

1.1.4 *Migrationstypen*

Die Zellmigration ist ein entscheidender Schritt bei der Tumorinvasion und Metastasierung. Migrationsvorgänge spielen beim Meningeom eine Rolle, speziell bei den höheren WHO-Graden wegen deren Invasion in Knochen und Hirngewebe und aufgrund ihrer potenziellen Metastasierung. In ihrer Zellkulturarbeit zur Rolle des *NF2*-Verlusts in meningealen Zellen und Meningeomzellen zeigten James et al., dass der Verlust des von *NF2* kodierten Proteins Merlin morphologische und ultrastrukturelle Konsequenzen hat, im Sinne der Auflösung der normalerweise

zwischen benachbarten meningealen Zellen existierenden, hochgeordneten Zell-Zell-Kontakte (James et al. 2008). Der Kontaktverlust ist die Voraussetzung einer erhöhten Motilität. Ebenso fanden sich diskrete Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts, inklusive einer Aktin-Ansammlung in gekräuselten Membranbereichen („membrane ruffles“) sowie eine vermehrte Bildung von Lamellipodien, die mit der Motilität der Zellen in Bezug stehen. Allein die Tatsache, dass ein in der Hälfte der Tumoren eliminiertes Tumorsuppressor u.a. eine migratorische Funktion besitzt, sollte die Aufmerksamkeit darauf lenken, ob Migration und ihre potenzielle pharmakologische Inhibition eine Rolle für die Prognose der Patienten spielen könnten.

Es gibt verschiedene Arten der Tumorzellmigration, entsprechend dem Zelltyp und dem Differenzierungsgrad. Die Migrationstypen werden von unterschiedlichen Mechanismen reguliert, dabei spielt für die Tumorzellmigration die Reorganisation des Aktinzytoskeletts eine zentrale Rolle. Diese Aktinreorganisation wird reguliert von der Familie der Rho-GTPasen (die zur Superfamilie der kleinen GTPasen gehören), wie Rho, Rac und Cdc42 (Yamazaki et al. 2005).

Die metastasierende Tumorzelle wendet zwei Migrationstypen an, zum einen die mesenchymale Migration und zum anderen die amöboide. Sie verfolgen zwei verschiedene Migrationsstrategien, „mesenchymal“ beruht auf der Strategie der Weggenerierung und „amöboid“ auf der Wegfindung. Bei der integrinabhängigen mesenchymalen Tumorzellmigration kommt es zur Ausbildung eines elongierten Phänotyps, zur Adhäsion der Migrationsfront an die Matrix und zur fokussierten perizellulären Proteolyse. Hingegen ist die amöboide Tumorzellmigration von Integrinen unabhängig und die Zellen bewegen sich mittels außerordentlicher Verformbarkeit durch die extrazelluläre Matrix ohne diese abzubauen. Es ist eine Transition von dem mesenchymalen Migrationstyp zum amöboiden möglich (MAT = mesenchymale-amöboide Transition), wenn beispielsweise Proteaseinhibitoren den Abbau der Matrix verhindern (Wolf et al. 2003).

Es besteht der Verdacht, dass besonders der mesenchymale Migrationsmodus bei bestimmten Meningeomsubtypen innerhalb des WHO-Grads I (fibroblastisch, transitional) eine Rolle spielt, aufgrund der elongierten, „fibroblastischen“ Zellmorphologie. In Abbildung 2 ist der Vergleich zwischen meningotheliale Meningeom und fibroblastischem Meningeom dargestellt. Meningotheliale

Meningeome haben kubischere Zellen, der Unterschied ist gut sichtbar an den Kernen.

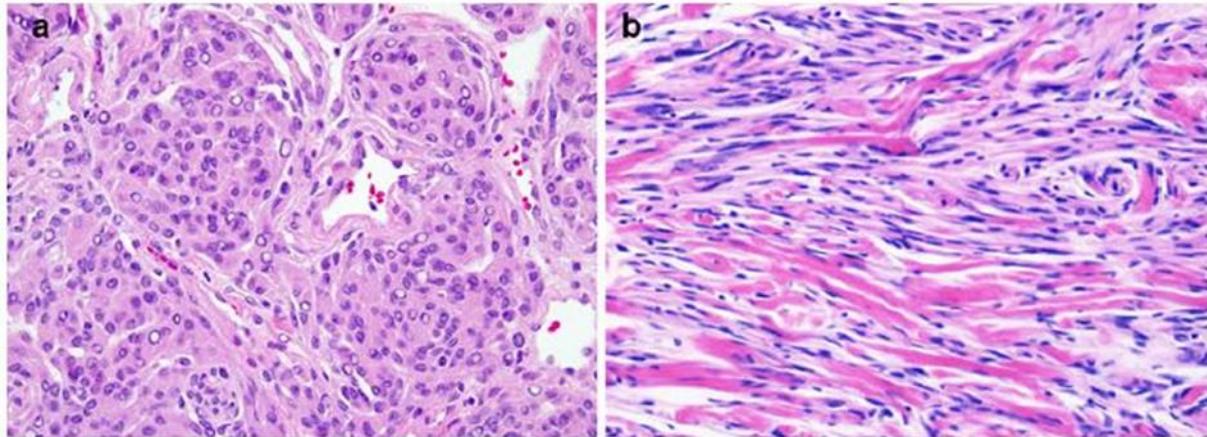


Abbildung 2: **a** - Meningotheliales Meningeom mit kubischen Zellen; **b** - Fibroblastisches Meningeom mit elongierten Zellen (Mawrin and Perry 2010).

Vor allem aber weist die Bedeutung Matrix-degradierender Exoenzyme, wie Matrix-Metalloproteinasen für die Invasivität des Meningeoms (Nordqvist et al. 2001; Okada et al. 2004; Okuducu et al. 2006; Tummalapalli et al. 2007; Barresi et al. 2011) deutlich in Richtung eines mit aktiver Matrix-Degradation verbundenen mesenchymalen Migrationsmodus. Als weiterer Anhaltspunkt für eine Verschiebung des epithelialen Zell-Phänotyps der meningealen Ausgangszellen zu einem mesenchymalen Phänotyp der Meningeomzellen mit entsprechendem Migrationsmodus mag der Verlust des besonders charakteristischen Desmosomen-Proteins E-Cadherin in 73% der Meningeome gewertet werden (Pecina-Slaus et al. 2012). Allerdings erscheint es z. Zt. noch fragwürdig, ob der Verlust dieses Proteins und einige andere beschriebene Alterationen (Pecina-Slaus et al. 2012), die von den Autoren postulierte epithelial-mesenchymale Transition (EMT) beweisen (Wallesch et al. 2017). In jedem Falle sind aber Desmosomen genau jene Zell-Zell-Kontakte, die benachbarte meningeale Zellen und deren Aktin-Zytoskelett miteinander verbinden und deren Auflösung durch *NF2*-Verlust getriggert wird (James et al. 2008). Der Verlust des E-Cadherins, der teilweise direkt auf chromosomalen Stückverlusten beruhen mag (Pecina-Slaus et al. 2012), bestätigt auf jeden Fall die Bedeutung des Desmosomen-Verlustes im Meningeom.

1.1.5 Therapie

Benigne Meningeome werden in den meisten Fällen durch Resektion komplett entfernt. Es können Rezidive auftreten, die hauptsächlich auf inkomplette Resektion des primären Tumors zurückzuführen sind (Adegbite et al. 1983; Mirimanoff et al. 1985). Bei atypischen und anaplastischen Meningeomen ist die Rezidivrate höher als bei den benignen und sie können Gehirngewebe infiltrieren, das erschwert weitere chirurgische Eingriffe. Obgleich Radiotherapie angewandt wird, rezidivieren diese Tumoren häufig und führen oft innerhalb weniger Jahre zum Tod (Mawrin and Perry 2010; Preusser et al. 2018). Die mediane Überlebensrate von anaplastischen Meningeomen (WHO-Grad III) liegt lediglich bei 1,5 Jahren (Perry et al. 1999). Bisher ist keine pharmakologische Therapie bei Meningeomen etabliert, ebenso keine, welche an der Migration angreift (Brokinkel et al. 2017). Eine Therapieoption wäre die zielgerichtete Hemmung einzelner relevanter Enzyme oder Rezeptoren. Am Institut für Neuropathologie der Otto-von-Guericke Universität wird daher seit Jahren an einem orthotopen Xenograftmodell des malignen Meningeoms getestet, ob eine gezielte Inhibition von Rezeptortyrosinkinasen wie PDGFR- β und von deren Signaltransduktion über mitogen aktivierte Kinasen (MAPK) bzw. über die Kinase-Achse PI3K/Akt/mTOR an Mäusen wirksam ist (Pachow et al. 2013a). Vergangene klinische Studien hatten bislang nur bescheidene positive Ergebnisse mit Hydroxyharnstoff bei wiederkehrenden Meningeomen gezeigt (Kyritsis 1996; Chamberlain and Blumenthal 2004; Newton 2007). Der Ribonukleotidreduktase-Hemmer Hydroxyharnstoff inhibiert die DNA-Synthese und ist deshalb ein Zytostatikum mit ähnlich unspezifischem Angriff auf Zellen mit hoher DNA-Syntheserate wie die klassischen DNA-Alkylantien. Ebenso Alkylantien, wie das beim aggressivsten Hirntumor, dem Glioblastom, bewährte Temozolomid, erzielten beim Meningeom geringe Effekte. In einer Serie zuvor behandlungsresistenter Meningeome zeigte sich keine partielle radiologische Antwort (Chamberlain et al. 2004). Mit ursächlich für das Versagen selbst dieser harschen Therapie könnte ein hoher Resistenzgrad in Meningeomen durch das Protein MGMT (O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase) sein (de Robles et al. 2008), weil MGMT klar mit einer solchen Resistenz assoziiert ist (Hegi et al. 2005). Zudem sind Alkylantien aufgrund ihrer Nebenwirkung und ihrer mutagenen Eigenschaften kaum geeignet zur Behandlung von Rezidiven benigner Meningeome.

Insgesamt existiert daher ein Bedarf zur Erforschung gezielter pharmakologischer Eingriffsmöglichkeiten. Dies betrifft zum einen für Meningeome besonders relevante mitogene Rezeptoren wie PDGFR- β und deren Signaltransduktion (s. o.), sollte aber zugleich die Erforschung neuer denkbarer Zielstrukturen einschließen, die bislang weniger beachtet wurden. Das könnten u. a. Migrations-assoziierte Zielstrukturen sein. Dazu gehören beispielsweise die in Meningeomen exprimierte Integrin-Heterodimere $\alpha\beta3$ und $\alpha\beta5$ (Bello et al. 2000; Wilisch-Neumann et al. 2013), denn diese könnten eine für den mesenchymalen Migrationsmodus entscheidende Wechselwirkung zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix vermitteln (Hood and Cheresh 2002). Ebenso von potenziellem Interesse sind die oben erwähnten kleinen GTPasen, die für diese Migration eine Rolle spielen. Diese miteinander in Verbindung stehenden Bereiche werden derzeit am Institut für Neuropathologie bearbeitet. Allerdings sollte der Blick offen sein für vollkommen neue Bereiche der molekularen Tumorforschung, wie etwa denjenigen der micro-RNAs (siehe Punkt 1.1.7).

1.1.6 *Integrine*

Die oben erwähnten Integrine sind heterodimere Rezeptoren auf der Zelloberfläche, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit und zuständig für die Kommunikation zwischen der extrazellulären Matrix (EZM) sowie dem Zellinneren. Sie sind wichtig für viele zelluläre Funktionen, wie Proliferation, Migration und Überleben. Es gibt mindestens 24 verschiedene Integrin-Heterodimere, die durch die Kombination von 18 α - und 8 β -Untereinheiten gebildet werden. Spezifische Integrin-Heterodimere binden vorzugsweise an unterschiedliche Proteine der EZM (Desgrosellier and Cheresh 2010).

Das Therapeutikum Cilengitide ist ein zyklisches RGD- (Tripeptid-Sequenz aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure) Pentapeptid und befindet sich derzeit in der klinischen Prüfung Phase III zur Behandlung von Glioblastomen und in Phase II für einige andere Tumoren. Dieses Medikament ist das erste anti-angiogene kleine Molekül, welches zielgerichtet auf die Integrine $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ und $\alpha5\beta1$ wirkt (Mas-Moruno et al. 2010). Cilengitide hemmt die Proliferation und die Differenzierung von endothelialen Vorläuferzellen, die eine wichtige Rolle bei der tumorinduzierten Neubildung von Blutgefäßen (Neoangiogenese) spielen (Oliveira-Ferrer et al. 2008).

Bei Gehirntumoren ist bekannt, dass sie Integrine exprimieren, neben der Funktion bei der Tumorangiogenese spielen sie eine wichtige Rolle bei der diffusen Hirninfiltration bei Gliomen (VanMeter et al. 2001). Die biologische Bedeutung der Integrine in Meningeomen wurde noch nicht ausführlich untersucht, jedoch zeigte sich in Meningeomen aller WHO-Grade eine Integrin Expression (Figarella-Branger et al. 1997; Beschet et al. 1999; Bello et al. 2000). Immunhistochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass in Meningeomen die Integrine $\alpha\beta 3$ und $\alpha\beta 5$ exprimiert werden (Bello et al. 2000). Hypothetisch könnten Integrine eine Rolle als entscheidende Moleküle bei der Wechselwirkung zwischen der Tumorzelle und der EZM spielen.

1.1.7 *Micro-RNA*

Des Weiteren wäre es interessant, mit Adhäsion und Migration assoziierte neue Mechanismen und Moleküle zu entdecken, die differentiell zwischen Meningeomen mit WHO-Grad II bzw. III und Meningeomen mit WHO-Grad I exprimiert sind. Zu Beginn der Doktorarbeit gab es eine Kandidaten-miRNA, die *miR-145*, welche die Bedingungen zu erfüllen schien.

Micro-RNAs (miRNAs) sind einzelsträngige Nukleinsäuren mit einer Länge von rund 22 Nukleotiden (nt), welche die eukaryotische Genexpression regulieren, indem sie die mRNA (messenger RNA)-Stabilität und vor allem die Translation beeinträchtigen (Bartel 2004). Eine einzelne miRNA kann unter Umständen die Synthese mehrerer hundert Proteine reprimieren und einige miRNAs spielen eine entscheidende Rolle in der Tumorbilogie (Calin and Croce 2006). Die ersten Mitglieder der miRNA-Familie waren *lin-4* und *let-7* und wurden als Entwicklungsregulatoren in dem Nematoden *C. elegans* (Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*) beschrieben. *Let-7* induziert beispielsweise den Übergang vom vierten Larvenstadium (L4) zum adulten Wurm durch Beeinflussung zahlreicher Zielgene, überwiegend Transkriptionsfaktoren oder Signalmoleküle (Reinhart et al. 2000; Grosshans et al. 2005). Außerdem wurde die *let-7*-Familie als relevanter Prognosefaktor beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom beschrieben (Takamizawa et al. 2004; Johnson et al. 2005). Viele miRNA-Spezies üben einen breiten Einfluss auf das zelluläre Proteom verschiedener Organismen aus, das schließt bei Säugetieren eine Rolle bei der Karzigenese und Tumorprogression ein, mitunter als Onkogene und manchmal als

Tumorsuppressoren (Esquela-Kerscher and Slack 2006). Ebenfalls wurde eine Rolle bei der Migration, Infiltration und Metastasierung beschrieben (Roldo et al. 2006; Tavazoie et al. 2008; Ma and Weinberg 2008).

MiR-145 wurde als Tumorsuppressor im kolorektalen Karzinom (Shi et al. 2007; La Rocca et al. 2009) diskutiert, des Weiteren hemmt sie die Invasion und Metastasierung bei Magenkrebs (Gao et al. 2013) und die Invasion bei Brustkrebs (Götte et al. 2010). Die Funktion der *miR-145* als Tumorsuppressor stellt in diesem Zusammenhang für Invasion und Proliferation von Tumorzellen einen interessanten Kandidaten bei humanen Meningeomen dar.

1.2 Ziele

Aufgrund der oben beschriebenen Notwendigkeit zur Etablierung neuer, zielgerichteter pharmakologischer Therapien des Meningeoms, ebenfalls unter Berücksichtigung der Migrations-Hemmung, war es notwendig, in der vorliegenden Arbeit ein geeignetes orthotopes Xenograft-Modell der Maus zu entwickeln und für solche Therapieversuche zu nutzen. Gleichzeitig sollte *in vitro* und später *in vivo* an dem entwickelten Mausmodell die Rolle der *miR-145* als potenzieller Tumorsuppressor für das Meningeom näher untersucht werden. Im Einzelnen verfolgte die vorliegende Arbeit dabei folgende Teilziele:

1. Bestätigung der am Institut für Neuropathologie detektierten Suppression von *miR-145* besonders in hochgradigen Meningeomen an einer unabhängigen Tumorerie. Dies würde den Verdacht erhärten, dass hier ein Tumorsuppressor vorliegt, der besonders in hochgradigen Meningeomen eine Rolle spielt. Suche nach Ursachen der negativen Regulation dieser miRNA in Meningeomen.
2. Bestätigung und vertiefte Analyse der Adhäsions- und Migrations-assoziierten Eigenschaften der *miR-145 in vitro* sowie Suche nach Migrations-assoziierten Zielmolekülen der *miR-145*.
3. Evaluierung der Expression von Integrinen in Meningeomen und der Wirkung des Integrinhemmers Cilengitide *in vitro*.
4. Aufbau eines realitätsnahen, orthotopen Xenograftmodells des malignen Meningeoms an der Maus.
5. Nutzung dieses Modells zur Evaluierung der Rolle von *miR-145 in vivo*.
6. Nutzung dieses Modells zur Evaluierung der therapeutischen Potenz eines Integrin-Inhibitors *in vivo*.

2 Materialien

2.1 Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden die in Tabelle 2 aufgelisteten Zelllinien verwendet.

Tabelle 2: Zelllinien

| Name | Zelltyp / Herkunft | Bezugsquelle |
|----------|-----------------------------------|---|
| HEK293T | Humane embryonale Nierenzellen | Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, D |
| IOMM-Lee | Humanes Meningeom (WHO-Grad III) | Prof. Dr. Gutmann, Institut für Neurologie, Washington University of Medical School, St. Louis, MO, USA |
| KT21-MG1 | Humanes Meningeom (WHO-Grad III) | Anita Lal, Brain Tumor Research Center, University of California, San Francisco, CA, USA |
| MCF-7 | Mammakarzinom | Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, D |
| MM-AN | Metastasierendes Melanom | H. Randolph Byers, Department of Dermatology, Boston University Medical School, Boston, MA, USA |
| SF4068 | Humanes Meningeom (WHO-Grad I) | Anita Lal, Brain Tumor Research Center, University of California, San Francisco, CA, USA |
| U-87 MG | Humanes Glioblastom (WHO-Grad IV) | ATCC (American Type Culture Collection), Manassas, VA, USA |
| U-118 MG | Humanes Glioblastom (WHO-Grad IV) | ATCC (American Type Culture Collection), Manassas, VA, USA |
| U-138 MG | Humanes Glioblastom (WHO-Grad IV) | ATCC (American Type Culture Collection), Manassas, VA, USA |

2.2 Tumormaterial

Es wurden 29 gefrorene humane Gewebeproben von Meningeomen (10 WHO-Grad I, 9 WHO-Grad II, 5 WHO-Grad III) für Real-Time PCR und Westernblot verwendet. Des Weiteren wurden Gewebe-Mikroarrays, welche Proben mit WHO-Grad I, II und III beinhalteten, immunhistochemisch gefärbt. Die Gewebe unterschiedlicher Malignitätsgrade entstammten der Tumorbank des Institutes für Neuropathologie der Universitätsklinik Magdeburg. Von der zuständigen Ethikkommission wurde die Verwendung des Tumormaterials zugelassen. Zusätzlich wurden freundlicherweise 5 Meningeom-Proben mit WHO-Grad III in RNA-Form von Prof. Guido Reifenberger aus dem Institut für Neuropathologie der Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

2.3 Primer

In den folgenden Abschnitten sind die jeweiligen verwendeten Primer für die Sequenzierung (2.3.1), cDNA-Synthese (2.3.2) und Real-Time PCR (2.3.3) aufgeführt.

2.3.1 Primer Sequenzierung

Tabelle 3: Primer für die Sequenzierung

| Name | Sequenz (5' -> 3') | Firma |
|----------------|--------------------|--|
| EF1-rev-Primer | GCACCCGTTCAATTGCCG | System Biosciences International (SBI), Mountain View, CA, USA |

2.3.2 Primer cDNA-Synthese

Tabelle 4: Primer für die cDNA-Synthese

| Name | Beschreibung | Annealing-Temperatur | Firma |
|---------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|
| Random-Primer | 25 µg/µl Hexanukleotide | 42°C | Bioline, Luckenwalde, D |

2.3.3 Real-Time PCR Primer

Tabelle 5: Real-Time PCR Primer

| Symbol | Beschreibung | Sequenz (5' -> 3') | Annealing-Temperatur |
|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------|
| CEBPB-F | C/EBP- β | GGGCTTGTTGCTGTTG ATGT | 57°C |
| CEBPB-R | C/EBP- β | AATATACAGACGCCTC TTTTCTC | 57°C |
| COL5A1-F | Collagen, type V, alpha 1 | CACAACCTTGCCTGATG GAATAACA | 60°C |
| COL5A1-R | Collagen, type V, alpha 1 | GCAGGGTACAGCTGCT TGGT | 60°C |
| hFSCN1-1352-F | humanes Fascin | ACCGCTCCAGCTATGA CGTC | 66°C |
| hFSCN1-1520-R | humanes Fascin | ATGGCCACCTTGTTAT AGTCG | 64°C |
| GAPDH-161-F | Referenzgen | AGGGCTGCTTTTAACT CTGG | 55°C |
| GAPDH-R-2 | Referenzgen | GGGATTTCCATTGATG ACAAG | 55°C |
| β 2MG-quant F | Referenzgen | CCAGCAGAGAAAAGTC | 58°C |
| β 2MG-quant R | Referenzgen | GATGCTGCTTGTCTCG | 58°C |
| MMP14-F | Matrix metallopeptidase 14 | ACATTGGAGGAGACAC CCAC | 62°C |
| MMP14-R | Matrix metallopeptidase 14 | TAGGCAGTGTTGATGG ACGC | 62°C |
| MMP16-F | Matrix metallopeptidase 16 | CTACCTTCCACCGACT GACC | 60°C |
| MMP16-R | Matrix metallopeptidase 16 | CCAAAATCCTCCCTC TCCA | 60°C |
| hNF2-ex1-2-fw | NF2 | AAGCAACCCAAGACGT TCAC | 60°C |

| Symbol | Beschreibung | Sequenz (5' -> 3') | Annealing-Temperatur |
|---------------|-------------------------|--------------------------|----------------------|
| hNF2-ex1-2-rv | NF2 | GGCACACCAAATCAAA GAGG | 60°C |
| SPG7-209-F | Spastic Paraplegia 7 | GACGAAGAGGAGAGG AGACG | 60°C |
| SPG7-R | Spastic Paraplegia 7 | TCCACCACGTCGCTCT CAG | 60°C |
| THBS1-138-F | Thrombospondin 1 | AGTGTAAGCTACCC TGATGG | 60°C |
| THBS1-R | Thrombospondin 1 | CGGTGCTCTCAATTGT GG | 60°C |
| THBS3-148-F | Thrombospondin 3 | GCAAGAAGGCGTATTT GAGG | 60°C |
| THBS3-R | Thrombospondin 3 | GGAGTGCAGTGCATTG GTC | 60°C |

2.4 LOH-Analyse

In der Tabelle 6 sind die verwendeten Mikrosatelliten für die LOH-Analyse aufgeführt.

Tabelle 6: Mikrosatelliten

| Name | Sequenz (5' -> 3') |
|---------------|----------------------|
| D5S413-F-FAM | AGTCACCTTCTCTGTCTCCA |
| D5S413-R | AGGCCTCATTCAAATCTGT |
| D5S2360-F-FAM | ATTAGTAAGAATCAAATG |
| D5S2360-R | CTCTCCACCTCAACATAT |

Das Kürzel "FAM" zeigt an, dass der Vorwärtsprimer in diesem System mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM am 5'-Ende markiert ist, sodass die PCR-Produkte in einer Kapillarelektrophorese auf einem Sequenziergerät (ABI 310C) mittels der Software GeneScan analysierbar sind.

2.5 Enzyme

Tabelle 7: Enzyme

| Name | Firma |
|-----------------------|-------------------------|
| Reverse Transkriptase | Bioline, Luckenwalde, D |

2.6 Antikörper

Die jeweiligen immunologischen Proteinnachweise wurden mit den in Tabelle 8 aufgeführten Primärantikörpern und in Tabelle 9 aufgeführten Sekundärantikörpern durchgeführt. Dabei wurden die Antikörper entsprechend den Angaben des Herstellers in 5%iger Blockierungslösung (vgl. Tabelle 12) eingesetzt.

Tabelle 8: Primärantikörper

| Name | Verdünnung | Hersteller |
|--|------------|---|
| β-Aktin (Anti-Maus) | 1:2000 | Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA |
| C/EBPβ (C-19): sc-150 (Anti-Kaninchen) | 1:400 | Santa Cruz, Dallas, TX, USA |
| COL5A1 (Anti-Maus) | 1:500 | Acris Antibodies, San Diego, CA, USA |
| Fascin (Anti-Maus) | 1:1000 | Abcam, Cambridge, UK |
| NF2 (Anti-Kaninchen) | 1:50000 | Abcam, Cambridge, UK |
| Phospho-C/EBPβ (Thr235) (Anti-Kaninchen) | 1:1000 | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |

Tabelle 9: Sekundärantikörper

| Name | Verdünnung | Hersteller |
|----------------------------------|------------|---|
| Anti-Kaninchen Ig, HRP-gekoppelt | 1:1000 | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| Anti-Maus Ig, HRP-gekoppelt | 1:1000 | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |

Des Weiteren wurden für die immunhistochemischen Färbungen des jeweiligen Gewebe-Mikroarrays die in Tabelle 10 aufgeführten Antikörper genutzt.

Tabelle 10: Monoklonale Antikörper

| Name | Hersteller |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| $\alpha\beta 3$ (Anti-Kaninchen) | Merck, Darmstadt, D |
| $\alpha\beta 5$ (Anti-Kaninchen) | Merck, Darmstadt, D |
| COL5A1 (Anti-Maus) | Acris Antibodies, San Diego, CA, USA |

2.7 Kits und Fertiglösungen

In der Tabelle 11 sind die eingesetzten Kits und Fertiglösungen samt Herstellern aufgelistet.

Tabelle 11: Kits und Fertiglösungen

| Produkt | Hersteller |
|---|---|
| Ambion® Pre-miR™ miRNA Precursors | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| BigDye-Terminator-Kit | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| CompactPrep Plasmid Midi Kit | QIAGEN, Hilden, D |
| DC Protein Assay Kit II | Bio-Rad, Hercules, CA, USA |
| FuGENE® HD Transfection Reagent | Promega, Madison, WI, USA |
| Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecules RT ² Profiler™ PCR Array: 330231 | SABiosciences, QIAGEN Company, Hilden, D |
| Immobilon Western HRP Substrat | Merck, Darmstadt, D |
| mirVana™ qRT-PCR miRNA Detection Kit | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| NucleoSpin® Tissue | Machery-Nagel, Düren, D |
| Opti-MEM® | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |

| Produkt | Hersteller |
|-----------------------------------|---|
| RNeasy Mini Kit | QIAGEN, Hilden, D |
| RT ² First Strand Kit | SABiosciences, QIAGEN Company, Hilden, D |
| siPORT™ NeoFX™ Transfection Agent | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |

2.8 Lösungen und Puffer

Die verwendeten Lösungen und Puffer und ihre jeweiligen Zusammensetzungen sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Lösungen und Puffer

| Lösung/ Puffer | Zusammensetzung |
|--------------------------|--|
| APS-Lösung (10 %) | 10 g Ammoniumpersulfat (APS) in 100 ml Aquadest |
| Blockierungslösung (5 %) | 5 g Magermilchpulver in 100 ml 1 x TBS-T |
| Einfriermedium | 50 ml high-glucose DMEM 12 ml FBS 3,5 ml DMSO |
| Laufpuffer (pH 8,3) | 15,1 g TRIS 72 g Glycin 5 g SDS in 5 l Aquadest |
| LB-Medium (pH 7,0) | 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 10 g Pepton 20 g Agar (bei Festmedium) in 1 l Aquadest |
| Lysis-Puffer | 1 ml RIPA-Puffer 10 µl 100 mM Natriumorthovanadat 10 µl Protease-Inhibitor-Mix 1 µl 1 M DTT |
| Narkoselösung | 1 ml 10 % Ketamin 1 ml 2 % Rompun in 8 ml physiologische Kochsalzlösung |

| Lösung/ Puffer | Zusammensetzung |
|--|--|
| PBS-T (PBS-Tween-Puffer) | 1 ml Tween 20 in 1 l 1 x PBS |
| RIPA-Puffer (pH 7,4) | 0,24 g TRIS 1,75 g NaCl 0,42 g NaF 4 ml 0,5 M EDTA 2 ml Triton-X 100 0,67 ml SDS (30%) 1 g Deoxycholat auf 200 ml mit Aquadest auffüllen |
| 5% SDS-Lösung | 10 g SDS in 200 ml Aquadest |
| 0,5 % SDS-Lösung | 25 ml 5% SDS-Lösung plus 225 ml Aquadest |
| SOC Medium (pH 7,0) | 2 g Pepton 0,5 g Hefeextrakt 60 mg NaCl (10 mM) 18,6 mg KCl (2,5 mM) 203,3 mg MgCl ₂ x 6 H ₂ O (10 mM) 246,5 mg MgSO ₄ x 7 H ₂ O (10 mM) 360,32 mg Glukose (20 mM) in 100 ml mit Aquadest auffüllen |
| 10 x TBS | 9 g TRIS 68,5 g TRIS-HCl 87,8 g NaCl in 1 l Aquadest |
| 1 x TBS-T (TBS-Tween-Puffer) (pH 7,5) | 100 ml TBS 1 ml Tween 20 in 900 ml Aquadest |
| Transferpuffer (pH 8,3) | 7,57 g TRIS 28,15 g Glycin 500 ml Methanol in 2 l Aquadest |
| 0,625 M TRIS-HCl (pH 6,8) | 18,9 g TRIS-HCl in 250 ml Aquadest |
| 1,88 M TRIS-HCl (pH 8,8) | 56,9 g TRIS-HCl in 250 ml Aquadest |

2.9 SDS-Polyacrylamidgele für Gelelektrophorese

In der Tabelle 13 sind die jeweiligen Zusammensetzungen der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele für die Gelelektrophorese aufgeführt.

Tabelle 13: SDS-Polyacrylamidgele für Gelelektrophorese

| | Sammelgel | 8%iges Trenngel | 15%iges Trenngel |
|--|-----------|-----------------|------------------|
| Aquadest [ml] | 1,3 | 3,3 | 1 |
| 30% Acrylamid + 0,8% Bisacrylamid [ml] | 0,5 | 2,7 | 5 |
| 0,625 M TRIS-HCl [ml] | 0,6 | | |
| 1,88 M TRIS-HCl [ml] | | 2 | 2 |
| SDS (0,5%) [ml] | 0,6 | 2 | 2 |
| TEMED [μ l] | 3 | 8,3 | 8,3 |
| APS [μ l] | 15 | 50 | 50 |

2.10 Bakterienstamm

Tabelle 14: Bakterienstamm

| Bakterienstamm | Genotyp | Firma |
|--------------------------|---|-------------------------------|
| XL1-Blue Competent Cells | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac^f ZΔM15</i> Tn 10 (Tet ^r)] | Agilent Technologies, CA, USA |

2.11 Plasmide

In dieser Arbeit wurden die in der Tabelle 15 aufgelisteten Plasmide verwendet.

Tabelle 15: Plasmide

| Name | Beschreibung | Firma |
|--------|--------------------------|-----------------------------|
| pMD2.g | VSV-G-Expressionsplasmid | Addgene, Cambridge, MA, USA |

| Name | Beschreibung | Firma |
|-------------------------------------|--|--|
| pMIRNA1-miR-145 | lentivirales Plasmid | System Biosciences International (SBI), Mountain View, CA, USA |
| psPAX2 | Verpackungsplasmid | Addgene, Cambridge, MA, USA |
| sh1 / HSH002541-1-LVRH1GP(OS200213) | Vektor: psi-LVRH1GP; Reporter gen: eGFP; Symbol: <i>COL5A1</i> (collagen, type V, alpha 1) | GeneCopoeia, Rockville, MD, USA |
| sh2 / HSH002541-2-LVRH1GP(OS200214) | Vektor: psi-LVRH1GP; Reporter gen: eGFP; Symbol: <i>COL5A1</i> (collagen, type V, alpha 1) | GeneCopoeia, Rockville, MD, USA |
| sh3 / HSH002541-3-LVRH1GP(OS200215) | Vektor: psi-LVRH1GP; Reporter gen: eGFP; Symbol: <i>COL5A1</i> (collagen, type V, alpha 1) | GeneCopoeia, Rockville, MD, USA |
| sh4 / HSH002541-4-LVRH1GP(OS200216) | Vektor: psi-LVRH1GP; Reporter gen: eGFP; Symbol: <i>COL5A1</i> (collagen, type V, alpha 1) | GeneCopoeia, Rockville, MD, USA |
| shKontrolle | Vektor: psi-LVRH1GP; Reporter gen: eGFP | GeneCopoeia, Rockville, MD, USA |

2.12 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von den in der Tabelle 16 angegebenen Firmen bezogen.

Tabelle 16: Chemikalien

| Chemikalie | Abkürzung/ Beschreibung | Firma |
|-------------------|----------------------------|-------------------------|
| Acrylamid (30 %) | | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Agar | | Merck, Darmstadt, D |
| Ammoniumpersulfat | APS | Merck, Darmstadt, D |

| Chemikalie | Abkürzung/ Beschreibung | Firma |
|---------------------------------------|----------------------------|---|
| Ampicillin, sodium salt | | Merck, Darmstadt, D |
| Ampullenwasser | Ampuwa | Fresenius Kabi, Bad Homburg, D |
| B27 Supplement | | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Bepanthen® Augen- und Nasensalbe | | Bayer, Leverkusen, D |
| Chloroform | CHCl ₃ | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Deoxycholat | | Serva, Heidelberg, D |
| Diaminobenzidin | DAB+ | Dako, Hamburg, D |
| Diethylpyrocarbonat | DEPC | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Dimethylsulfoxid | DMSO | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Dithiothreitol | DTT | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| dNTPs | | Bioline, Luckenwalde, D |
| Dubelcco´s modifiziertes Eagle Medium | high glucose DMEM | PAN-Biotech, Aidenbach, D |
| Entwickler | | Agfa HealthCare, Greenville, SC, USA |
| Eosin | | Merck, Darmstadt, D |
| Ethanol | EtOH | Fischar, Saarbrücken-Scheidt, D |
| Ethylendiamintetraessigsäure | EDTA, sodium salt | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Fetales Rinderserum | FBS | PAN-Biotech, Aidenbach, D |
| Fixierer | | Agfa HealthCare, Greenville, SC, USA |

| Chemikalie | Abkürzung/ Beschreibung | Firma |
|--------------------------------|---|--|
| Formaldehyd | CH ₂ O | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Glukose | C ₆ H ₁₂ O ₆ | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Glycerin | Propan-1,2,3-triol | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Glycin | | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Hämatoxylin-Lösung | | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Hefeextrakt | | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Histoacryl® | Gewebekleber | B. Braun, Melsungen, D |
| HME03 Kulturmedium | Gentamycin, L-Glutamin | Cell Concepts, Umkirch, D |
| Isofluran | | Baxter, Deerfield, IL, USA |
| Isopropanol | C ₃ H ₈ O | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Kaliumchlorid | KCl | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Ketamin | | Intervet, Unterschleißheim, D |
| Ladepuffer | | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| 2 x Ladepuffer | 2 x Sample Buffer nach Laemmli | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| 5 x Ladepuffer | 5 x Protein Loading Buffer | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Magermilchpulver | | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Magnesiumchlorid Hexahydrat | MgCl ₂ x 6 H ₂ O | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat | MgSO ₄ x 7 H ₂ O | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Matrigel™ | | BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA |

| Chemikalie | Abkürzung/ Beschreibung | Firma |
|--|------------------------------------|---|
| Methanol | | J.T.Baker, Deventer, NL |
| Natriumacetat | | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Natriumchlorid | NaCl | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Natriumfluorid | NaF | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Natriumlaurylsulfat | SDS | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Natriumorthovanadat | NaVO ₃ | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Neurobasal-A | | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Paladur | Zahnzement | Heraeus Kulzer, Hanau, D |
| Penicillin/Streptomycin | PS | PAN-Biotech, Aidenbach, D |
| Pepton | | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Phosphatgepufferte Salzlösung steril | 1 x PBS steril | PAN-Biotech, Aidenbach, D |
| Phosphatgepufferte Salzlösung unsteril | 10 x PBS unsteril | PAN-Biotech, Aidenbach, D |
| Physiologische Kochsalzlösung | | Fresenius Kabi, Bad Homburg, D |
| ProTaq [®] Clear | Xylol-Ersatz | Quartett, Berlin, D |
| ProTaq [®] PARAmount | | Quartett, Berlin, D |
| Protease-Inhibitor-Mix | | Serva, Heidelberg, D |
| Rhodamin B Dextran | | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Rompun | Xylazin | Bayer, Leverkusen, D |
| ROX-500-Längenstandard | | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |

| Chemikalie | Abkürzung/ Beschreibung | Firma |
|-----------------------------|--|---|
| Salpetersäure | HNO ₃ | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Salzsäure | HCl | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Standardmarker für Proteine | PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 - 180 kDa; PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 - 250 kDa | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Stripping Puffer | Restore™ Western Blot Stripping Buffer | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| SYBR® Green | RT ² SYBR Green ROX FAST Mastermix | QIAGEN, Hilden, D |
| Tetramethylethylendiamin | TEMED | Serva, Heidelberg, D |
| TRIS | | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| TRIS-HCl | TRIS Hydrochlorid | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Triton X 100 | | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| TRIzol® Reagent | | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Trypsin | | PAN-Biotech, Aidenbach, D |
| Tween® 20 | Polysorbat | Merck, Darmstadt, D |
| Wasserstoffperoxid | H ₂ O ₂ | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Xylocain® Gel 2% | | AstraZeneca, London, UK |

2.13 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterial | Art | Hersteller |
|----------------------------|------------------------------------|---|
| 6-Well-Platten (steril) | Cellstar® | Greiner Bio-One, Kremsmünster, A |
| 96-Well-Platten (steril) | Nunclon™ Surface | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| 96-Well-Platten (unsteril) | Nunc™ Edge | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Deckgläser | runde Deckgläser, Durchmesser 5 mm | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Dentalkanüle | 100 Sterican® 27 G x 1 ” | B. Braun, Melsungen, D |
| Einmal-Kultur-Einsätze | | Ibidi, München, D |
| Einmalpipetten (steril) | 1 ml, 10 ml, 25 ml | Greiner Bio-One, Kremsmünster, A |
| Einmalskalpell | | B. Braun, Melsungen, D |
| Einmalspritzen | Injekt®-F | B. Braun, Melsungen, D |
| Einmalzählkammern | SD 100 | Peqlab, Erlangen, D |
| Einmalzellschaber | | TPP®, Trasadingen, CH |
| ECL-Film | Amersham Hyperfilm ECL, 14 x 28 cm | GE Healthcare, Buckinghamshire, UK |
| Keramik-Kügelchen | Precellys Keramik-Kügelchen 1,4 mm | Peqlab, Erlangen, D |
| Kryoröhrchen | CryoPure 2 ml | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Mikroreaktionsgefäße | 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml | Eppendorf, Hamburg, D |
| Millicell Membran | 0,4 µm Porengröße | Merck, Darmstadt, D |
| Nitrocellulosemembran | Protran | GE Healthcare, Buckinghamshire, UK |

| Verbrauchsmaterial | Art | Hersteller |
|-----------------------------|---|--|
| Petrischalen | | Greiner Bio-One, Kremsmünster, A |
| Pipettenspitzen | 1 µl - 5000 µl | Eppendorf, Hamburg, D |
| Verpackungsfolie | Saran | The DOW Chemicals, Midland, MI, USA |
| Zellkulturflaschen (steril) | 25 cm ² , 75 cm ² | Greiner Bio-One, Kremsmünster, A |
| Zentrifugenröhrchen | 15 ml, 50 ml | BD-Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA |

2.14 Geräte

In der Tabelle 18 sind die verwendeten Geräte und deren Hersteller aufgelistet.

Tabelle 18: Geräte

| Gerät | Modell | Hersteller |
|---|--|--|
| ABI Prism® 310C Kapillarsequenziergerät | ABI Prism® 310C DNA Sequencer | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| ABI Prism® Real-Time-PCR | ABI Prism® 7000 Sequence Detection System | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| Automat für Röntgenfilme/ Entwicklermaschine | Curix 60 | Agfa HealthCare, Greenville, SC, USA |
| Beatmungspumpe | Minivent Beatmungspumpe für Mäuse | FMI, Seeheim-Ober Beerbach, D |
| Brutschrank | CB150 | Binder, Tuttlingen, D |
| Dentalbohrer | Omnidrill 35 115/230V | WPI, Sarasota, FL,USA |
| Dispergierer | T 10 basic ULTRA- TURRAX® | IKA, Staufen, D |

| Gerät | Modell | Hersteller |
|-------------------------|-----------------------------------|---|
| Einfriergefäß | Mr. Frosty™ | Nalgene®, Rochester, NY, USA |
| ELISA-Reader | Infinite M200 | Tecan, Männedorf, CH |
| Heizblock | Rotilab®Block-Heater H250 | Carl Roth, Karlsruhe, D |
| Heizplatte | ATC1000 | WPI, Sarasota, FL,USA |
| Homogenisator | Precellys 24 | Peqlab, Erlangen, D |
| Infrarotlampe | SIL06 | Sanitas, Wals, D |
| Kaltlichtquelle | KL 1500 LCD | Zeiss, Jena, D |
| Magnetrührer | Variomag Mono | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Messschieber | Digital-Messschieber ABS | Promat, Hamburg, D |
| Mikroliter-Spritze | Typ 1701 RNR 10 µl (22s/51 mm) | Hamilton, Reno, NV, USA |
| Phasenkontrastmikroskop | Axiovert 40 CFL | Zeiss, Jena, D |
| pH-Meter | CG 842 | Schott, Mainz, D |
| Photometer | BIOPhotometer | Eppendorf, Hamburg, D |
| Schlittenmikrotom | | Leica, Solms, D |
| Schüttler | REAX-Top | Heidolph, Fürth, D |
| Stereotaxie-Rahmen | Für Mäuse | WPI, Sarasota, FL, USA |
| Stickstofftank | CryoFreezer 350 | Ingenieursdienst, Kiel, D |
| Ultraschall-Laborgerät | UP 100H Ultraschallprozessor | Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, D |

| Gerät | Modell | Hersteller |
|------------------------|------------------------|-------------------------------|
| Thermocycler | Mastercycler | Eppendorf, Hamburg, D |
| Thermoschüttler | Thermomixer Comfort | Eppendorf, Hamburg, D |
| Vakuumzentrifuge | Concentrator 5301 | Eppendorf, Hamburg, D |
| Waage | Pioneer™ | Ohaus, Nänikon, CH |
| Waage | | Satorius, Göttingen, D |
| Warmluftschüttler | Inkubationshaube TH 30 | Edmund Bühler, Tübingen, D |
| Wasserbad | WB 22 | Memmert, Schwabach, D |
| Western Blot-Apparatur | Mini Trans-Blot® Cell | Bio-Rad, Hercules, CA, USA |
| Zellzähler | Cellometer™ Auto T4 | Peqlab, Erlangen, D |
| Zentrifuge | Multifuge X1R | Heraeus, Hanau, D |
| | Mikro 22R | Hettich, Kirchlengern, D |

3 Methoden

3.1 Zelllinien

Für diese Arbeit wurden humane Meningeom-Zelllinien verwendet. Die maligne Meningeom-Zelllinie IOMM-Lee überließ uns D. H. Gutmann (Institut für Neurologie, Washington University of Medicine, St. Louis, MO, USA). Charakterisiert wurde diese Zelllinie, welche aus einem intraossären malignen Meningeom gewonnen wurde, erstmals von Lee (Lee 1990). Des Weiteren wurde von Anita Lal (Brain Tumor Research Center, University of California, San Francisco, CA, USA) freundlicherweise die Zelllinie KT21-MG1 zur Verfügung gestellt, welche ebenfalls eine maligne Meningeom-Zelllinie ist und von Tanaka et al. publiziert wurden (Tanaka et al. 1989).

Es wurden IOMM-Lee Meningeom-Zelllinien hergestellt, die eine humane pri-miR-145 stabil überexprimieren und den Fluoreszenzmarker GFP (grün fluoreszierendes Protein) exprimieren. Dazu wurde ein lentiviraler Vektor, dem diese pri-miRNA einkloniert wurde, in pseudovirale Partikel verpackt, die erfolgreich in die IOMM-Lee Zelllinie transfiziert wurden. Im Folgenden wird diese Zelllinie als IOMM-miR-145 bezeichnet. Gleichzeitig wurden entsprechende Kontroll-Linien mit einem unbeladenen Vektor generiert, im Weiteren als IOMM-miRKO benannt. Diese stellen präzisere Kontrollen als die Parentallinie IOMM-Lee dar.

3.2 Kultivierung der humanen Meningeom-Zelllinien

Die adhärenenten humanen Meningeom-Zelllinien wurden mit 15 ml DMEM-Vollmedium [high-glucose DMEM-Medium, dem 10% FBS und 1% Penicillin-Streptomycin-Stammlösung hinzugefügt wurden (von PAN-Biotech, Aidenbach, D)] in 75 cm² großen Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One, Kremsmünster, A) im Brutschrank (Binder, Tuttlingen, D) bei 37 °C, 5% CO₂ und hoher Luftfeuchtigkeit kultiviert (Standardbedingungen). Mediumwechsel und eine erneute Aussaat der Zellen erfolgte in Abhängigkeit von der Zelldichte und dementsprechend meist alle zwei bis vier Tage. Hierfür wurde das alte Medium mit einer Pipette entfernt und die Zellen wurden mit 1 x PBS (kalzium- und magnesiumfrei - von PAN-Biotech, Aidenbach, D) gewaschen. Danach folgte die Ablösung der Zellen mit Trypsin (0,5 mg/ml - von PAN-Biotech, Aidenbach, D) und deren Aufnahme in 1 x PBS, um diese

anschließend bei 1000 rpm zehn Minuten zu zentrifugieren. Der entstandene Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in DMEM-Vollmedium resuspendiert. Nach einer Zellzahlbestimmung mit Hilfe des Cellometer™ Auto T4 (Peqlab, Erlangen, D) wurden die Zellen in notwendiger Dichte neu ausgesät.

3.3 Kryokonservierung und Rekultivierung der Zelllinien

Zur Kryokonservierung der Zelllinien wurden die Zellen, wie unter Abschnitt 3.2 beschrieben, nach dem Ablösen mit Trypsin mit 1 x PBS gewaschen und daraufhin für 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde PBS entfernt und das Zellpellet mit einem Einfriermedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 11) resuspendiert. In 1 ml Aliquoten wurden sie dann in Kryoröhrchen überführt und in einem Einfriergefäß (Mr. Frosty™, Nalgene®, Rochester, NY, USA), welches Isopropanol (Carl Roth, Karlsruhe, D) enthält, langsam auf -80 °C heruntergekühlt. Zur längeren Lagerung wurden die Zellen in einen Stickstofftank mit -180 °C gebracht (CryoFreezer, Ingenieurdienst, Kiel, D).

Zur Rekultivierung wurden die Zellen mit Hilfe eines 37 °C warmen Wasserbads aufgetaut und danach in einer 75 cm² großen Zellkulturflasche (Greiner Bio-One, Kremsmünster, A) und in 15 ml DMEM-Vollmedium eingesät. Nachdem sich die Zellen angeheftet hatten, wurde das Medium vollständig gewechselt, so dass das im Einfriermedium enthaltene DMSO (Carl Roth, Karlsruhe, D), welches ein zelltoxisches Lösungsmittel ist, entfernt wurde.

3.4 RNA-Isolierung mit Trizol

Die RNA-Isolierung basierte auf der Einzelschrittmethod (single step method) von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987) mit Hilfe von TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

3.4.1 RNA-Isolierung aus Gewebe

Zur RNA-Isolierung wurden ungefähr 30 mg Gewebe von Kryogewebebe-
proben entnommen. Diese Gewebebe-
proben wurden in ein 2 ml Röhrchen gegeben, welches
vorbefüllt war mit Keramik-Kügelchen (Precellys Keramik-Kügelchen, Peqlab,
Erlangen, D) des Durchmessers von 1,4 mm und nach anschließender Zugabe von
1 ml TRIzol® Reagent in einem Homogenisator (Precellys 24, Peqlab, Erlangen, D)

zerkleinert wurden. Das erfolgte bei 5000 rpm für zweimal 20 Sekunden. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Röhrchen gegeben und mit 300 µl Chloroform (Carl Roth, Karlsruhe, D) versehen und für 15 Sekunden kräftig manuell geschüttelt. Danach folgte ein 10-minütiger Inkubationsschritt bei Raumtemperatur. Im Anschluss daran wurden die Proben für 15 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Durch die dabei entstandene Phasentrennung konnte die obere wässrige Phase, welche die RNA enthielt, isoliert und in ein neues 1,5 ml Röhrchen überführt werden. Zur Fällung der RNA wurden 700 µl Isopropanol hinzugefügt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das RNA-Pellet mit 500 µl 80%igem eiskalten Ethanol (hergestellt mit DEPC-Wasser) zweimal gewaschen, in dem wieder für jeweils 10 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde. Im Anschluss daran wurde das RNA-Pellet in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg, D) getrocknet und letztendlich mit entsprechender Menge an DEPC-Wasser (je nach der Größe des RNA-Pellets) und 10-minütiger Inkubation im Heizblock (Carl Roth, Karlsruhe, D) bei 64°C gelöst. Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, D) und die Lagerung der RNA-Proben bei -80 °C.

3.4.2 RNA-Isolierung aus adhärennten Zellen

Die adhärennten Zellen wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen (Greiner, Kremsmünster, A) ausgesät und unter Standardbedingungen (siehe Abschnitt 3.2) kultiviert bis sie zu ungefähr 90% konfluent waren. Das DMEM-Vollmedium wurde verworfen und die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml TRIzol® Reagent und eine Inkubationszeit von 5 Minuten. Die Zellen lösten sich ab und konnten in ein 2 ml Röhrchen überführt werden und anschließend wurden 300 µl Chloroform hinzugegeben. Die weiteren Schritte sind identisch mit der RNA-Isolierung aus Gewebe (siehe Abschnitt 3.4.1).

3.5 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die reverse Transkription diente der Umschreibung von RNA in cDNA (komplementäre DNA), die im weiteren Verlauf für die Durchführung einer Real-Time PCR benötigt wurde. Das Enzym Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) wird für die cDNA-Synthese verwendet. Für die Synthese von 40 µl cDNA wurden 2 µg RNA mit 8 µl Random-Primer (25 µg/µl Hexanukleotide, Bioline, Luckenwalde, D) gemischt und anschließend mit DEPC-Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei 70 °C im Thermocycler (Mastercycler, Eppendorf, Hamburg, D) erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen. Im Anschluss daran folgte eine 5-minütige Abkühlung auf Eis. Für den nächsten Schritt wurde folgender Reaktionsansatz zur Probe hinzugefügt:

- 8 µl 5-fach Puffer (Bioline, Luckenwalde, D)
- 0,8 µl dNTPs (Bioline, Luckenwalde, D)
- 0,25 µl Reverse Transkriptase (Bioline, Luckenwalde, D)
- 10,95 µl DEPC-Wasser.

Im Anschluss daran wurden die Proben im Thermocycler für 55 Minuten bei 42 °C und für 15 Minuten bei 70 °C erhitzt. Die erhaltene cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

3.6 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR (Real-Time quantitative PCR) basiert auf einer herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) in Anwesenheit eines Fluoreszenzfarbstoffs, der in die doppelsträngige DNA interkaliert und die Quantifizierung der Produkte durch Fluoreszenzmessungen am Ende jedes PCR-Zyklus ermöglicht (Higuchi et al. 1992, 1993; Ginzinger 2002). Die gemessene Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge des PCR-Produktes. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR® Green (RT² SYBR Green ROX FAST Mastermix, QIAGEN, Hilden, D) verwendet. Der Vorteil der Real-Time PCR besteht somit darin, jede PCR-Reaktion zu verfolgen und nicht nur das Endergebnis, wie bei der herkömmlichen PCR, zu sehen.

Zur Durchführung der Real-Time PCR mit dem ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) wurde für je 1 µl cDNA folgender Reaktionsansatz hergestellt:

- 8,26 µl SYBR® Green
- 5,3 µl HPLC-Wasser
- 1 µl Vorwärts-Primer
- 1 µl Rückwärts-Primer.

Die Messung der Proben erfolgte in Zweifachbestimmung. Die einzelnen Phasen und die Temperaturbedingungen der Real-Time PCR sind in Tabelle 19 dargestellt, wobei sich die Annealing-Temperatur nach den verwendeten Primern richtet (siehe Tabelle 5).

Tabelle 19: Bedingungen Real-Time PCR

| Reaktionsschritt | Temperatur (°C) | Dauer (min) | Wiederholung(en) |
|------------------------|-----------------|-------------|------------------|
| Initiale Denaturierung | 95 | 10 | 1 |
| Denaturierung | 95 | 0,30 | |
| Annealing | 55 / 60 | 0,30 | 40 |
| Elongation | 72 | 0,45 | |

Nach 40 Wiederholungen erfolgte zur Qualitätskontrolle eine langsame Denaturierung durch einen Temperaturanstieg von 60 °C auf 95 °C. Es wurde eine Dissoziationskurve (Schmelzkurve) erstellt. Anhand dieser Schmelzkurvenanalyse konnte die Reinheit der Reaktionsprodukte bestimmt werden. Die Bestimmung der Basislinie und die Berechnung der Anzahl der Kopien wurden automatisch unter Verwendung der Software des ABI Prism® durchgeführt. Mit Hilfe dieser Software erhält man den Grenzwert (threshold) der Fluoreszenz und die Berechnung der C_t -Werte (cycle threshold), bei denen die Fluoreszenz der einzelnen Proben erstmals den festgelegten Grenzwert überschreitet. Die Bestimmung der relativen Expression (E_r) einer Nukleinsäuresequenz in einer Probe erfolgt auf der Basis des logarithmischen Zusammenhangs zwischen der Kopienzahl und dem C_t -Wert. Eine Normierung der Kopienzahl auf ein Referenzgen (housekeeping gene) ist notwendig, da diese von der eingesetzten Menge der cDNA und der Effizienz der cDNA-Synthese abhängt. Das Referenzgen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit in den zu vergleichenden Proben konstant exprimiert. Die relative Expression des analysierten Gens in der jeweiligen Probe ergibt sich folgendermaßen: $E_r = 1/2^{\Delta C_t}$. Wobei die

Differenz der C_t -Werte (ΔC_t) aus dem C_t -Wert des Zielgens (Z) und dem C_t -Wert des Referenzgens (R) gebildet wird: $\Delta C_t = C_t(Z) - C_t(R)$.

3.7 Real-Time PCR mit dem mirVana™ qRT-PCR miRNA Detection Kit

Um eine Real-Time PCR unter Verwendung des mirVana™ qRT-PCR miRNA Detection Kits (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) durchzuführen, wurde zunächst RNA aus Gewebe isoliert (siehe Absatz 3.4.1). Für die cDNA-Synthese wurde RNA in der Konzentration 25 ng/μl benötigt und diese erfolgte nach den Protokoll-Angaben des Herstellers. Es kamen folgende mirVana RT Primer zum Einsatz: *miR-145* und 5S-rRNA als Referenz (die Primersequenzen für das mirVana-System wurden vom Hersteller optimiert und nicht mitgeteilt). Die Verlässlichkeit des in der vorliegenden Arbeit im Detail weiterverfolgten *miR-145*-Systems ergab sich zudem aus folgenden Argumenten : a) Nachweis einer je nach Zustand der Zellkultur 15- bis 30-fachen Überexpression von *miR-145* in IOMM-miR-145 im Vergleich zu IOMM-miRKO im Verlaufe routinemäßiger Kontrollen dieser Linien mit dem mirVana-System in der Arbeitsgruppe der Neuropathologie und b) fast deckungsgleiche Ergebnisse bezüglich *miR-145* (30-fache Überexpression in IOMM-miR-145) zwischen miRVana-PCR und einem humanen Expressions-Array (drei Experimente). Die Array-Experimente waren am DKFZ (Heidelberg) für die Arbeitsgruppe der Neuropathologie Magdeburg für andere Zwecke gemacht worden und die Arrays enthielten zufällig ebenso das *miR-145*-Gen.

Die Bedingungen der Real-Time PCR am ABI Prism® (ABI Prism® 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Bedingungen Real-Time PCR mirVana

| mirVana | Temperatur (°C) | Dauer (min) | Wiederholung(en) |
|------------------------|-----------------|-------------|------------------|
| Initiale Denaturierung | 95 | 3 | 1 |
| Denaturierung | 95 | 0,15 | 40 |
| Annealing / Elongation | 60 | 0,3 | |
| Dissoziation | 60 → 95 | 20 | |

3.8 RT² Profiler™ PCR Array System

Mit dem Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecules RT² Profiler™ PCR Array: 330231 (SABiosciences, QIAGEN Company, Hilden, D) erfolgte über Real-Time PCR die parallele Analyse von 84 Genen, welche wichtig für Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen sind. Zunächst wurde dafür die RNA-Isolierung aus IOMM-miR-145 Zellen und IOMM-miRKO Zellen mit dem RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, D) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese mit dem RT² First Strand Kit (SABiosciences, QIAGEN Company, Hilden, D) ebenfalls wieder nach den Angaben des Herstellers. Danach wurde die Real-Time PCR am ABI Prism® (ABI Prism® 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Die entsprechenden Einstellungen sind in der Tabelle 21 aufgelistet. Die Analyse der Daten erfolgte webbasiert mit der PCR Array Data Analysis Software (SABiosciences, QIAGEN Company, Hilden, D). Für die insgesamt nur kleine Zahl in ihrer Expression zwischen den beiden Zelllinien abweichender Gene, wurde zur Sicherheit ebenso manuell anhand der $\Delta\text{-C}_T$ -Werte die relative Expressionsänderung der *miR-145*-rekonstituierten Zellen (2^{ΔC_t}) gegenüber den Kontrollzellen dargestellt (siehe Abbildung 21 des Ergebnisteils). In der Abbildung sind die relativen Änderungen bei der Zelllinie IOMM-miR-145 in Bezug auf IOMM-miRKO als Referenz dargestellt. Ein negatives Vorzeichen bedeutet somit eine verminderte Expression in *miR-145*-rekonstituierten Zellen.

Tabelle 21: Bedingungen Real-Time PCR RT² Profiler™ PCR Array

| RT ² Profiler™ PCR Array | Temperatur (°C) | Dauer (min) | Wiederholung(en) |
|---|-----------------|-------------|------------------|
| Aktivierung der HotStart DNA Polymerase | 95 | 10 | 1 |
| Denaturierung | 95 | 0,15 | 40 |
| Annealing / Elongation | 60 | 1 | |

3.9 Sequenzierung

Das lentivirale Plasmid pMIRNA1-miR-145 und das korrespondierende Kontrollplasmid, die zur Herstellung der Lentiviren zur stabilen Transfektion von IOMM-Lee-Zellen benutzt worden waren, stammten beide von System Biosciences International (SBI), Mountain View, CA, USA. Sie waren zuvor auf das Vorhandensein bzw. Fehlen des korrekten miRNA-145-Gens durch Sequenzierung mit dem von SBI angegebenen EF1-rev-Primer (gcacccgttcaattgccg) geprüft worden. In gleicher Weise erfolgte später die gelegentliche Prüfung der transfizierten IOMM-Zellen. Die Sequenzierung erfolgte gemäß Herstellerangaben mit dem BigDye-Terminator-Kit der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) auf dem 1-Kapillarsequenziergerät ABI-310C derselben Firma.

Die lentiviralen Plasmide waren unter freundlicher Mithilfe von Dr. Diana Panayotova Dimitrova (damals Arbeitsgruppe Leverkusen, Hautklinik Magdeburg) amphotrop verpackt worden. Sie waren dazu 1:1:1 mit den Hilfsplasmiden psPAX2 und pMD2.G (beide Addgene, USA) gemischt und mittels Fugene-Reagenz nach Standardmethode des Labors in HEK-293T-Zellen im 6-well-Format gegeben worden. Mit 1 ml des 72 h-Überstand erfolgte eine direkte Transfektion von IOMM-Lee-Zellen in T25-Flaschen (5 ml DMEM) ohne vorherige Aufkonzentrierung des Virus. Die Zellen erschienen im Fluoreszenzmikroskop grün. Nach hinreichender Expansion (10 T75-Flaschen) wurden die Zellen per FACS auf die Qualität der Transfektion geprüft und zum weiteren Gebrauch in flüssigem Stickstoff eingefroren. Im Verlaufe der hier vorliegenden Arbeit wurden Grünfluoreszenz, *miR-145*-Expression und Sequenz der miRNA-Kassette in Abständen überprüft.

3.10 LOH-Analyse (Loss of Heterozygosity, chromosomale Stückverluste)

Die LOH-Analyse wurde an 27 Meningeomen (15 WHO-Grad I, 10 WHO-Grad II, 2 WHO-Grad III) gepaart mit Blutproben durchgeführt. Die genomische DNA der eingefrorenen Tumorproben wurde mit den im molekularpathologischen Routinelabor etablierten Methoden gewonnen. Dazu wurde das Präparationskit für genomische DNA der Firma Macherey-Nagel (NucleoSpin® Tissue, Macherey-Nagel, Düren, D) gemäß den Herstellerangaben benutzt. Danach erfolgte die PCR mit den Primern D5S413-F-FAM, D5S413-R, D5S2360-F-FAM und D5S2360-R für 30 Zyklen bei einer Annealtemperatur von 60°C, wobei die Vorwärtsprimer mit 6-FAM

fluoreszenzmarkiert waren. Nach dem Mischen mit Ladepuffer und ROX-500-Längenstandard gemäß Vorschrift der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) wurden die PCR-Produkte einer Fragmentlängenanalyse unterzogen. Dazu wurde das Gemisch mittels Kapillarelektrophorese auf dem ABI-310C-Sequenziergerät (Applied Biosystems) analysiert. Es erfolgte eine Auswertung mit dem Programm GeneScan (Applied Biosystems) mit automatischer Identifikation der Peaks (Allele) der polymorphen Marker und Schätzung der DNA-Menge jedes Allels (AUC, area under curve) durch die Software GeneScan. Im Anschluss daran wurden durch den Experimentator zunächst die nicht-informativen Fälle ausgesondert, bei denen väterliches und mütterliches Allel des verwandten Mikrosatelliten die gleiche Länge aufwiesen (1 Allel im Blut des Patienten). Daraufhin wurde für die verbliebenen Fälle ermittelt, ob ein Verlust eines der beiden Allele im Tumor (LOH) auftrat.

3.11 Pre-miR-145 Transfektion von IOMM-Zellen

Die pre-miR-145 Transfektion erfolgte an vier verschiedenen Passagen von IOMM-Lee Zellen. Die IOMM-Lee Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und dann in DMEM-Medium mit FBS und ohne Antibiotikum gegeben (87000 Zellen/ml, Gesamtmenge mindestens 13 ml). Kurz vor dem Beginn der transienten Transfektion wurden die Zellen warm gestellt. Das Transfektionreagenz siPORT (siPORT™ NeoFX™ Transfection Agent, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) und Opti-MEM® (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) mussten auf Raumtemperatur erwärmt werden, anschließend siPORT kurz vortexen, mit Opti-MEM® verdünnen (25 µl siPORT in 500 µl Opti-MEM®) und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen. Als nächstes wurden jeweils 19 µl der pre-miR-145 mit 250 µl Opti-MEM® und 19 µl der pre-miR Kontrolle mit 250 µl Opti-MEM® gemischt (Ambion® Pre-miR™ miRNA Precursors, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Im Anschluss daran wurden je 250 µl des siPORT/ Opti-MEM®-Gemisches hinzugegeben und wieder für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden die zuvor warmgehaltenen Zellen nochmals geschwenkt und davon jeweils 5,8 ml mit je einem Ansatz gemischt und in je eine kleine Zellkulturflasche (25 cm²) gegeben. Die Zellkulturflaschen wurden für 24 Stunden im Brutschrank belassen und danach erfolgte die RNA-Isolierung mit TRIzol® Reagent (siehe Abschnitt 3.4.2).

3.12 Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* (*Escherichia Coli*) erfolgte auf LB-Agar-Platten und in flüssigem LB-Medium (Zusammensetzung siehe Tabelle 12) auf einem Warmluftschüttler (Inkubationshaube TH 30, Edmund Bühler, Tübingen, D) bei ca. 200 rpm/min und 37 °C. Durch den Zusatz des Antibiotikums Ampicillin (100 µg/ml) in das Nährmedium konnten Kolonien selektiert werden, welche das gewünschte Plasmid enthielten.

3.13 Lagerung von Bakterienkulturen

Zur langfristigen Lagerung von Bakterienkulturen wurden je 700 µl Flüssigkultur in LB-Medium mit 200 µl sterilem Glycerin (Carl Roth, Karlsruhe, D) gemischt und bei -80°C gelagert.

3.14 Transformation von *E. coli*

Zur Vermehrung von Plasmiden wurden kompetente Zellen vom Typ XL1-Blue (XL1-Blue Competent Cells, Agilent Technologies, CA, USA) verwendet. Die Transformation erfolgte nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll. Zu Beginn wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und je Transformationsansatz 100 µl aliquotiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 1,7 µl β-Mercaptoethanol behandelt und 10 min auf Eis inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde dabei alle 2 min leicht geschüttelt. Im darauffolgenden Schritt wurden 0,1 - 50 ng Plasmid-DNA zu den kompetenten Zellen gegeben und das Zellen-DNA-Gemisch für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte ein Hitzeimpuls bei 42 °C für genau 45 s, dem sich eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min anfügte. Des Weiteren wurden die Zellen mit 0,9 ml auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium (Zusammensetzung siehe Tabelle 12) suspendiert und 1 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Um die Zellen nach der Inkubation zu konzentrieren, wurden sie 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand bis auf verbleibende 50 µl abgenommen. Die Zellen wurden resuspendiert und auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin gegeben und über Nacht bei 37 °C in einem Warmluftschüttler inkubiert.

3.15 Plasmid-Präparation

Die Präparation von bis zu 20 µg hochreiner Plasmid-DNA aus einer Übernacht-Kultur von *E. coli* (25 ml LB-Flüssigmedium mit 0,1 mg/ml Ampicillin, angeimpft mit einer Bakterienkolonie von der LB-Agar-Platte) erfolgte mit einem Kitsystem (CompactPrep Plasmid Midi Kit, Qiagen, Hilden, D) und wurde nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

3.16 Transfektion von Meningeom-Zelllinie mit shRNA Plasmiden

In Zusammenarbeit mit der Experimentellen Hämatologie und Onkologie der Universitätsklinik Magdeburg (AG Heidelberg) erfolgte die Transfektion einer Meningeom-Zelllinie (IOMM-Lee) in dessen Labor mit entsprechender Sicherheitsstufe 2. Zunächst wurde eine Transfektion von HEK293T-Zellen mit dem Vektor psi-LVRH1GP (GeneCopoeia, Rockville, MD, USA - Vektorkarte siehe Anhang, Abbildung 38) zusammen mit dem lentiviralen Verpackungsplasmid psPAX2 (Addgene, Cambridge, MA, USA - Vektorkarte siehe Anhang, Abbildung 39) und dem VSV-G-Expressionsplasmid pMD2.G (Addgene, Cambridge, MA, USA - Vektorkarte siehe Anhang, Abbildung 40) mithilfe des Transfektionsreagens FuGENE (Promega, Madison, WI, USA) durchgeführt. Die Transfektion mit FuGENE beruht auf dem Prinzip der Lipofektion und wurde im Verhältnis 3 : 1 (FuGENE : Plasmid-DNA) angewandt. Die lentiviralen Partikel befanden sich im Überstand (Medium) der HEK293T-Zellen und wurden jeweils 36 h und 48 h nach der Transfektion geerntet. Dieser lentivirale Überstand wurde anschließend filtriert auf die IOMM-Lee-Zellen gegeben (lentivirale Infektion). Vier Tage nach der lentiviralen Infektion wurde mithilfe eines Durchflusszytometers die GFP-Fluoreszenz gemessen. Die Zellen wurden fünf Tage nach der lentiviralen Infektion, wie in Absatz 3.17.2 beschrieben, geerntet und Proteinextrakte daraus gewonnen, um diese im Western Blot auf einen Knockdown zu prüfen.

3.17 Proteinisolierung

Die Proteinisolierung erfolgte mit RIPA-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 12). Diesem wurde kurz vor der Verwendung, zur Hemmung der endogenen Proteasen, 10 µl/ml Protease-Inhibitor Mix (Serva, Heidelberg, D) und 10 µl/ml 100 mM Natriumorthovanadat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), sowie 1 µl/ml 1 M DTT

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) hinzugefügt; im Folgenden als Lysis-Puffer bezeichnet. Die einzelnen Schritte der Proteinisolierung fanden auf Eis bzw. bei 4 °C statt, um den Abbau der Proteine durch zelleigene Proteasen nach Möglichkeit zu verhindern.

3.17.1 *Proteinisolierung aus Kryogewebe*

Zunächst wurde ungefähr 30 mg Gewebe von einer Tumorprobe (bei -80 °C gelagert, Kryogewebe) entnommen und mit etwa 300 µl frisch angesetztem Lysis-Puffer überschichtet. Im Anschluss daran wurde das Gewebe mit einem Dispergierer (T 10 basic ULTRA-TURRAX®, IKA, Staufen, D) homogenisiert und danach folgte die Entfernung der Gewebereste durch Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde in ein 2 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

3.17.2 *Proteinisolierung aus Zellkulturen*

Zur Proteinisolierung aus Zellkulturen wurde zunächst das Medium von den Zellen entfernt und anschließend zweimal durch vorsichtiges Schwenken der Zellkulturflasche mit 1 x PBS gewaschen. PBS wurde danach ebenfalls entfernt und je nach Konfluenz der adhärennten Zellen wurde eine entsprechende Menge frisch angesetzter Lysis-Puffer (75 cm² große Zellkulturflaschen: 150 - 350 µl) auf die Zellen gegeben. Die Zellkulturflaschen wurden für 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit einem Zellschaber (TPP®, Trasadingen, CH) abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 2 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und mit dem UP 100H Ultraschallprozessor (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, D) durch Ultraschall homogenisiert; anschließend für 15 min bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand mit den enthaltenen Proteinen wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und bei -80 °C gelagert.

3.17.3 *Proteinbestimmung*

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem DC Protein Assay Kit II (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in 96-Well-Platten (NuncTM Edge, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dieser Assay beruht auf der Reaktion von Proteinen in alkalischer Lösung mit Kupfer,

bei der Proteine mit Cu^{2+} -Ionen einen Komplex bilden und die Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{+} -Ionen reduziert werden (Biuret-Reaktion) und der anschließenden Reaktion mit dem Folin-Reagenz, wobei ein blauer Farbkomplex entsteht (Lowry-Test). Diese blaue Farbe hat ihr Absorptionsmaximum bei 750 nm und ihr Absorptionsminimum bei 405 nm. Die optische Dichte des Farbkomplexes ist direkt proportional zur Proteinkonzentration. Die photometrische Messung der Proben erfolgte bei einer Wellenlänge von 750 nm und einer Referenzwellenlänge von 450 nm mit einem ELISA-Reader (Infinite M200, Tecan, Männedorf, CH) und der Verwendung der Magellan™ - Data Analysis Software (Tecan, Männedorf, CH). Aus der mitgeführten BSA-Standard-Verdünnungsreihe (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2,0; 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA) wurde eine Eichkurve erstellt und anhand dieser konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden.

3.18 Western Blot

Die Übertragung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Trägermembran wird als Western Blot bezeichnet. Der spezifische Nachweis auf der Trägermembran (im Folgenden eine Nitrocellulosemembran) kann durch Immundetektion (Reaktion mit spezifischen Antikörpern) erfolgen. Das Gießen der jeweiligen Gele, die Gelelektrophorese und der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurden mit einer vertikalen Western Blot-Apparatur, der Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), durchgeführt.

3.19 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteingemischen wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) nach Laemmli (Laemmli 1970) mit Tris-Glycin-Puffern verwendet. Bei dem Laemmli-System überschichtet ein großporiges Sammelgel ein kleinporiges Trenngel. Es wurden folgende SDS-Acrylamidgele verwendet: ein Sammelgel und ein 8%iges bzw. 15%iges Trenngel (Zusammensetzung der einzelnen Gele siehe Tabelle 13). Zunächst wurden jeweils 40 μg Proteinproben mit einem 2 x Ladepuffer (2 x Sample Buffer nach Laemmli, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oder einem 5 x Ladepuffer (5 x Protein Loading Buffer, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) versehen und 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Der Ladepuffer beinhaltet u.a. SDS, welches die Proteine zu

negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen bindet und durch das Erhitzen werden Sekundär- und Tertiärstrukturen aufgebrochen. Bei der SDS-PAGE wandert der SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zum Plus-Pol. Ebenso ist β -Mercaptoethanol in dem Probenpuffer enthalten, welcher wiederum dafür sorgt, dass die vorhandenen Disulfidbrücken durch Reduktion gespalten werden. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis abgekühlt, um so wiederum den denaturierten Zustand zu gewährleisten. Danach folgte das Auftragen der Proben in die einzelnen Probentaschen des Sammelgels. Es wurde ebenfalls jeweils ein Standardmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 - 180 kDa; PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 - 250 kDa; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) zur Abschätzung der Proteingröße mitgeführt. In dem anschließenden elektrophoretischen Verfahren wanderten die negativ geladenen Proben zunächst bei einer Stromstärke von 15 mA (ca. 10 Minuten) durch das Sammelgel, in dem die Konzentration der Proteine erfolgte und danach für ungefähr eine Stunde bei 30 mA durch das wie ein Sieb wirkende Trenngel, bis die Lauffront die untere Kante der Platten erreicht hat, wobei die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte. Die kleineren und somit leichteren Proteine wanderten schneller als die mit einem höheren Molekulargewicht. Die Zusammensetzung des für den Gellauf benötigten Laufpuffers ist in der Tabelle 12 beschrieben.

3.20 Proteintransfer

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Protran, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) erfolgte ebenfalls mit Hilfe der Mini Trans-Blot® Cell Apparatur nach den Angaben des Herstellers. Die Blotkammer wurde mit einem Transferpuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 12) aufgefüllt und der Transfer erfolgte für 1 bis 2 Stunden bei einer Stromstärke von 200 mA, je nach der Größe des zu untersuchenden Proteins. Im Anschluss daran mussten die restlichen Proteinbindungsstellen der Membran mit einem Blocker abgesättigt werden. Dafür wurde die Membran in eine Blockierungslösung (vgl. Tabelle 12) gegeben.

3.21 Immunologischer Nachweis

Für den immunologischen Nachweis wurde die Nitrocellulosemembran nach dem Proteintransfer für 1 h bei Raumtemperatur in eine 5%ige Blockierungslösung

(Zusammensetzung siehe Tabelle 12) inkubiert. Anschließend wurde ein für das zu detektierende Protein spezifischer primärer Antikörper (vgl. Tabelle 8) auf die Membran gegeben und es folgte eine Inkubation über Nacht unter leichtem Schütteln bei 4 °C. Danach wurde die Membran mit PBS-T (Zusammensetzung siehe Tabelle 12) gewaschen, zweimal 5 min und zweimal 10 min. Den Waschschritten schloss sich eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit einem sekundären HRP (Meerrettichperoxidase)-gekoppelten Antikörper (vgl. Tabelle 9), der sich spezifisch an den konstanten Teil des primären Antikörpers bindet, an. Im Anschluss daran wurde die Membran ebenfalls wieder zweimal 5 min und zweimal 10 min gewaschen, diesmal mit 1 x PBS. Danach folgte die Chemilumineszenzdetektion unter Verwendung des Immobilon Western HRP Substrat (Merck, Darmstadt, D) nach Angaben des Herstellers. Der Substratumsatz auf ECL-Film (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) wurde mit Hilfe eines Automaten für Röntgenfilme, dem Curix 60 (Agfa HealthCare, Greenville, SC, USA), entwickelt und die spezifische Immunreaktion sichtbar gemacht.

3.22 Stripping und Wiederverwendung der Nitrocellulosemembran

Für weitere Nachweise von Proteinen konnte die Nitrocellulosemembran wiederverwendet werden. Dafür mussten die gebundenen Antikörper von der Membran mit einem Stripping Puffer (Restore™ Western Blot Stripping Buffer, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) für 45 min abgelöst werden. Anschließend folgten zwei Waschschriffe für 10 Minuten mit TBS-T. Bevor die Membran mit dem nächsten primären Antikörper behandelt werden konnte, musste sie erneut für eine Stunde mit der Blockierungslösung geblockt werden.

3.23 Präparation und Kultivierung organotypischer und hippokampaler Schnittkulturen

Für die Präparation von organotypischen hippokampalen Schnittkulturen (OHC) wurden rote DCX-DS Ratten (Dr. Sebastien Couillard-Despres, Institute of Molecular Regenerative Medicine, Paracelsus Medical University Salzburg) vom postnatalen Tag 9 verwendet. Nach der Dekapitation wurden beide Hippocampi freigelegt und mit einem Gewebeschnneider in 350 µm dicke koronare Schnitte zerteilt. Anschließend sind die Schnitte mit Hilfe einer sterilen Pinzette separiert und auf eine Millicell Membran mit 0,4 µm Porengröße (Merck, Darmstadt, D) überführt worden. Die

Membranen mit den Schnitten wurden in 6-Loch-Zellkulturplatten mit je 900 μ l HME03 Kulturmedium (mit Gentamycin, L-Glutamin, Cell Concepts, Umkirch, D) mit 25% Pferde-Serum gegeben. Die Kultivierungszeit betrug 7 Tage und während dieser Zeit wurde alle zwei Tage das Medium gewechselt. Nach dem dritten Tag wurden die Kulturen in HME03 mit 25% Neurobasal-A (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) und 5% B27 Supplement (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) überführt. Nach der Kultivierungszeit mussten geschädigte Schnitte entfernt werden. Die Selektion erfolgte mit Hilfe der Zugabe von 1,2 μ M Propidiumiodid für 12 Stunden. Anschließend wurden die Schnitte in DMEM-Vollmedium überführt und mit je 25000 IOMM-miR-145 oder IOMM-miRKO Zellen pro Schnitt für 24 bis 48 Stunden inkubiert.

3.24 OHC-Beobachtung mit Zwei-Photonen-Mikroskop

Die Beobachtung der einzelnen OHCs erfolgte mit Hilfe eines Laser Scanning-Mikroskops (LSM 7MP, Zeiss, Jena, D). Dieses Mikroskop ist mit einem MaiTai Zwei-Photonen-Laser (Newport Spectra-Physics, Darmstadt, D) und einem Zeiss 20x Wasser-Immersion Objektiv (1,0 NA) ausgestattet. Das erzeugte Fluoreszenzlicht wird zu zwei Non Descanned-Detektoren bei 850 nm weitergeleitet. Es wurde die ZEN Software 2009 (Zeiss, Jena, D) genutzt. Zunächst wurden die einzelnen OHCs direkt nach Zugabe der jeweiligen Zellen mit dem Zwei-Photonen-Mikroskop beobachtet und gefilmt. Die nächsten Beobachtungen erfolgten 24 und 48 Stunden später.

Die Experimente am Zwei-Photonen-Mikroskop erfolgten in Zusammenarbeit mit dem Institut für Molekulare und Klinische Immunologie (AG Schraven) der Universitätsklinik Magdeburg und dem DZNE in Magdeburg (Arbeitsgruppe Reymann: Pathophysiologie der Demenz).

3.25 Mausmodelle

Alle Mausmodelle wurden mit immundefizienten Nacktmäusen (Swiss Nude Mice, Charles River, Burlington, MA, USA) durchgeführt, welche mindestens 8 Wochen alt sein mussten.

Sämtliche Tierexperimente wurden mit einer Tierschutzrechtlichen Genehmigung durchgeführt (AZ des LVA: 42502-2-1013 UniMD, 42502-2-1195 UniMD, 42502-2-956 UniMD).

3.25.1 *Subkutane Tumorinjektion in Nacktmäusen*

Die entsprechenden Zellen, die der Nacktmaus injiziert werden sollten, wurden zunächst mit Hilfe von Trypsin von den Zellkulturflaschen abgelöst und einmal mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurde ein 1:1 Gemisch mit Matrigel™ (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) und den Zellen in PBS hergestellt. Die Tiere bekamen eine kurze Inhalationsnarkose mit Isofluran (Baxter, Deerfield, IL, USA), anschließend wurde die Haut desinfiziert und danach 3×10^6 Zellen (vgl. Tabelle 22) beidseits im Nackenbereich subkutan (s.c.) injiziert. Mindestens einmal wöchentlich wurde das Tumolvolumen mittels eines Messschiebers (Promat, Hamburg, D) am lebenden Tier, welches zuvor wieder eine kurze Isofluran-Inhalationsnarkose bekam, ausgemessen. Dabei wurden zwei senkrecht zueinander verlaufende Achsen am Tumor gemessen und gemäß der Formel $V = \pi/6 \times a \times b^2$, wobei $a > b$ war, wurde das jeweilige Tumolvolumen bestimmt. Am 14. (Tiere denen IOMM-miR-145 bzw. IOMM-miRKO Zellen injiziert wurden) bzw. 17. Tag (Tiere denen IOMM-Lee Zellen injiziert wurden) nach der Tumorinjektion wurden die Tiere getötet (vgl. Tabelle 22).

Die 15 Versuchstiere, die mit IOMM-Lee Zellen (vgl. Tabelle 22) injiziert wurden, waren für ein Behandlungsexperiment mit Cilengitide vorgesehen. Ab dem 3. Tag nach der Zelinjektion wurden 8 von den 15 Tieren täglich i.p. (fünf Tage die Woche) 8 mg/kg Körpergewicht Cilengitide verabreicht. Die restlichen sieben Tiere zählten zur Kontrollgruppe und bekamen statt dessen i.p. eine physiologische Kochsalzlösung.

Tabelle 22: Übersicht der Versuchstiere für die subkutane Tumordinjektion

| | IOMM-Lee Zellen (3×10^6) | IOMM-miR-145 Zellen (3×10^6) | IOMM-miRKO Zellen (3×10^6) |
|--------------------------|--|--|--|
| Anzahl der Versuchstiere | 15 | 7 | 7 |
| Tötung der Tiere | 17. Tag | 14. Tag | 14. Tag |

3.25.2 Intrakranielle Tumorapplikation in Nacktmäusen

Die Nacktmäuse wurden durch intraperitoneale (i.p.) Injektion einer Narkoselösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 12) anästhesiert. Dafür wurde zunächst das Tier gewogen und es konnten ca. 8 μ l/g Körpergewicht verabreicht werden. Die narkotisierte Maus wurde auf eine kleine Heizplatte (ATC1000, WPI, Sarasota, FL, USA) gelegt, so dass ihre Körpertemperatur konstant gehalten werden konnte. Anschließend wurde der Maus Xylocain® Gel 2% (AstraZeneca, London, UK) auf den Ohrenbereich gegeben, so dass durch die spätere Befestigung entstehende Druckpunkte an diesen Stellen keine Schmerzen verursachten. Die Maus wurde in einem Stereotaxie-Rahmen (WPI, Sarasota, FL, USA) befestigt. Damit die Augen während des Eingriffs nicht austrocknen, wurden sie mit einer Augensalbe (Bepanthen®, Bayer, Leverkusen, D) eingerieben. Als zusätzliche Beleuchtung wurde eine Kaltlichtquelle (KL 1500 LCD, Zeiss, Jena, D) genutzt. Als erstes wurde mit Hilfe eines Skalpell mit einem ca. 10 mm langen Sagittalschnitt die Kopfhaut median geöffnet. Auf den offenen Bereich wurde 2%ige Wasserstoffperoxid-Lösung gegeben, um so die Knochenhaut zu entfernen und eine zusätzliche Desinfektion zu erreichen. Im Anschluss daran wurde jeweils links und rechts ca. 1,5 mm lateral von der Sagittalnaht des Schädelknochens zwischen Bregma (ca. 2 mm vor dem Bregma) und Lambda mit einem Dentalbohrer (Omnidril 35 115/230V, WPI, Sarasota, FL, USA) ein Loch (ca. 0,8 mm Durchmesser) in den Schädelknochen gebohrt. Der Bereich wurde anschließend mit in physiologischer Kochsalzlösung getränkten Wattestäbchen gesäubert. Danach wurden 2 μ l PBS mit 1×10^5 Zellen bzw. 2,5 μ l PBS mit $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Bohrloch (vgl. Tabelle 23) subarachnoidal (1 mm tief) mit einer Mikroliter-Spritze [1701 RNR (10 μ l), Hamilton, Reno, NV, USA] appliziert. Die Trepanationswunden blieben offen und der Schnitt der Kopfhaut wurde mit einem Gewebekleber (Histoacryl®, B. Braun, Melsungen, D) geschlossen.

Anschließend wurde die Maus zurück in den Käfig gelegt und dieser befand sich bis zum Erwachen der Maus unter einer Infrarotlampe (SIL06, Sanitas, Wals, D).

Tabelle 23: Intrakranielle Tumorapplikation

| | KT21-MG1 Zellen | IOMM-Lee Zellen | IOMM-miR- 145 Zellen | IOMM-miRKO Zellen |
|--|-------------------------------------|--|---|--|
| Intrakranielle Applikation je Bohrloch | 2,5 µl PBS mit $2,5 \times 10^5$ | 2,5 µl PBS mit $2,5 \times 10^5$ | 2 µl PBS mit 1×10^5 | 2 µl PBS mit 1×10^5 |
| Anzahl der Versuchstiere | 10 | 60 | 7 | 7 |
| Anzahl der Versuchstiere Behandlung mit 8 mg/kg Cilengitide / Kontrollgruppe | | 7 / 7 | | |
| Anzahl der Versuchstiere Behandlung mit 75 mg/kg Cilengitide / Kontrollgruppe | 5 / 5 | 24 / 22 | | |
| Anzahl der Tiere Überlebenszeit- versuch | | 21 (ohne MRT) | | |
| Anzahl der Tiere mit Bestrahlung | | 21 (davon 9 für Über- lebenszeit- versuch) | | |
| MRT Termine nach der Zellapplikation | 21. Tag | Erster Termin am 4. Tag; Zweiter Termin am 10. Tag | Erster Termin am 7. Tag; Zweiter Termin am 14. Tag | Erster Termin am 7. Tag; Zweiter Termin am 14. Tag |

3.25.3 *Behandlung der Nacktmäuse mit Cilengitide*

Die Nacktmäuse, denen 2,5 µl PBS mit $2,5 \times 10^5$ IOMM-Lee Zellen bzw. KT21-MG1 Zellen (vgl. Tabelle 23) appliziert wurden, waren für ein Behandlungsexperiment mit Cilengitide vorgesehen. Hierfür wurde die eine Hälfte der Tiere ab dem 3. Tag nach der Zellapplikation täglich (fünf Tage pro Woche) i.p. mit Cilengitide (entsprechende Dosis siehe Tabelle 23) behandelt und die andere Hälfte mit physiologischer Kochsalzlösung (Kontrollgruppe). Davon wurden 12 Tiere, denen IOMM-Lee Zellen appliziert wurden, noch zusätzlich einer Bestrahlung unterzogen (6 davon bekamen i.p. 75 mg/kg Cilengitide und die anderen 6 physiologische Kochsalzlösung). Die Tiere wurden jeweils am Vormittag bestrahlt und am Nachmittag der Behandlung mit Cilengitide bzw. physiologischer Kochsalzlösung unterzogen. Die Bestrahlung wurde an der Klinik für Strahlentherapie, Universitätsklinikum Magdeburg durchgeführt. Am 3. und 6. Tag nach der Zellapplikation erfolgte die Röntgenbestrahlung (5 Gy, Gulmay-3225) auf den Bereich des Gehirns. Das verfügbare Bestrahlungsgerät erlaubte eine selektive Kopfbestrahlung. Aus diesem Grund wurde das Knochenmark nicht belastet. Deswegen war es selbst bei einer in zwei Teile fraktionierten Gesamtdosis von 10 Gy nicht notwendig, die Tiere antibiotisch abzuschirmen. Dies galt, obwohl die Tiere bereits durch ihren Genotyp (nude) einen partiellen Immundefekt aufwiesen.

Weitere 21 Mäuse, denen ebenfalls IOMM-Lee Zellen appliziert wurden, waren für einen Überlebenszeitversuch vorgesehen. 9 Mäuse (5 davon bekamen i.p. 75 mg/kg Cilengitide und die anderen 4 physiologische Kochsalzlösung) wurden zusätzlich zwei Bestrahlungsterminen (3. und 6. Tag nach Zellapplikation, je 5 Gy) ausgesetzt. Die restlichen 12 wurden lediglich i.p. mit 75 mg/kg Cilengitide (6 Mäuse) bzw. physiologischer Kochsalzlösung (6 Mäuse) behandelt. Die Überlebenszeit war definiert als die Zeitspanne zwischen Tumorzellinokulation und dem Tag der tierethisch indizierten Tötung der Tiere nach zuvor festgelegten, standardisierten Kriterien. Die Kriterien orientierten sich an den Vorgaben der GV-SOLAS für tumortragende Mäuse und waren von der zuständigen Tierschutzkommission im Rahmen des Genehmigungsverfahrens gebilligt worden. Die tatsächlich im Experiment eingetretenen Tötungsgründe waren meist Gewichtsverlust >20% oder deutlich verminderte Reaktion (Apathie) sowie gelegentlich ein außen sichtbarer

Tumordurchbruch am Kopf. Weitere Tötungskriterien (Lähmungen von Gliedmaßen oder erkennbare epileptische Anfälle) traten nicht auf.

Aufgrund dieser geringen Bandbreite eingetretener Tötungsgründe und angesichts der Entscheidung durch den immer gleichen Beobachter war ein Maximum an Objektivität bei der Beurteilung der Überlebenszeiten gewährleistet.

3.25.4 Magnetresonanztomographie (MRT) des intrakraniellen Tumorwachstums

Um die Kinetik des intrakraniellen Tumorwachstums zu ermitteln, wurden MRT-Aufnahmen der Mäuse angefertigt (Zeitschema siehe Tabelle 23). Dabei wurden Bilder der axialen Schnittebene erstellt. Die Messungen erfolgten mit einem 4.7T-Tierscanner (Bruker BioSpin, Karlsruhe, D) am Leibniz-Institut für Neurobiologie in Magdeburg im Speziallabor für Nicht-Invasive Bildgebung. Die Volumen der einzelnen Tumoren wurden mit der frei zugänglichen Software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) ermittelt. Für die Volumenanalyse wurde das Tumoreal manuell in jedem Schnitt bestimmt und mit der Schichtdicke der Schnitte (0,8 mm) multipliziert. Das Tumorgewebe, das durch die Injektion in jeweils zwei Bohrlöchern gewachsen war, wurde als ein einzelner Tumor für die statistische Analyse zusammengefasst.

3.25.5 Dekapitation der Nacktmäuse und Präparation der Tumorgewebe mit anschließender Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung)

Nach Beendigung des jeweiligen Experiments mit intrakranieller Tumorapplikation in Nacktmäusen, wurden die Tiere durch Dekapitation getötet. Danach wurde die Haut vom Schädel entfernt und die Schädel wurden mindestens 48 Stunden in 4%-igem Formaldehyd aufbewahrt und anschließend für 4 Stunden bei 60°C entkalkt (im Gemisch aus 9,75% Salpetersäure, 1,85% Formalin und 0,37 M Natriumactetat). Im Anschluss daran wurde der tumortragende Bereich herausgeschnitten und in Paraffin eingebettet. Gemäß der in der humanen Histopathologie üblichen Standardmethoden erfolgte zunächst eine Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 96%, 100%), dann eine Überführung in einen Xylol-Ersatz (ProTaq[®]Clear, Quartett, Berlin, D) und schließlich die Einbettung in Paraffin (65°C warm) auf Kunststoff-Trägern. Mit einem Schlittenmikrotom (Leica, Solms, D) wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte für spätere Färbungen mit Hämatoxylin-Eosin hergestellt.

Verschiedene Strukturen der Gewebeschnitte können mit der H&E-Färbung sichtbar gemacht werden, durch Hämatoxylin-Lösungen erfolgt die Kernfärbung (dunkelblau) und mit Eosin-Lösungen die Zytoplasmafärbung (rötlich). Dafür war eine Entparaffinierung der Gewebeschnitte mit Hilfe von Xylol-Ersatz für zweimal 10 Minuten notwendig. Als nächstes wurden die Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 70% Ethanol) rehydriert und vorsichtig mit Aquadest abgespült. Danach erfolgte eine fünfminütige Inkubation mit einer Hämatoxylin-Lösung (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Anschließend wurden die Schnitte mit Aquadest gespült und es folgte eine kurze Differenzierung in einer 1%-igen Salzsäure-Ethanol-Lösung. Die Schnitte wurden ein weiteres Mal mit Aquadest gespült und danach mit heißem Leitungswasser gebläut. Im Anschluss daran wurden die Schnitte 3 Minuten mit einer 1%igen Eosin-Lösung (Merck, Darmstadt, D) angefärbt. Es folgte ein erneutes Spülen mit Aquadest und kurz hintereinander einmal mit 70%-igem Ethanol und zweimal mit 96%-igem und 100%-igem Ethanol, damit überschüssiges Eosin auszieht. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Xylol-Ersatz behandelt und die Konservierung erfolgte durch Eindecken mit ProTaq® PARAmount (Quartett, Berlin, D).

3.25.6 *Histochemische H&E-Färbungen und Immunhistochemie*

In der vorliegenden Arbeit wurden Gewebeproben von Maus und Mensch, z.T. in Form von am Institut für Neuropathologie bereits hergestellter Gewebe-Mikroarrays (Tissue Microarray, TMA), ebenfalls histologisch untersucht. Die Gewebe-Mikroarrays setzten sich dabei aus kleinen Zylindern von Meningeomproben aller WHO-Grade zusammen, die aus am Institut vorhandenen Paraffinblöcken ausgestanzt und in jeweils größerer Zahl in einem einzigen Paraffinblock (Empfängerblock) zusammen neu eingebettet worden waren. Dies erlaubte die gleichzeitige Anfärbung von Proben unterschiedlicher WHO-Grade und histologischer Subtypen mit Antikörpern unter konstanten Reaktionsbedingungen. Die in 4% Formalin fixierten Gewebeproben der Maus wurden nach üblichen Standardverfahren des histologischen Routinelabors in aufsteigender Alkoholreihe entwässert, über den Xylol-Ersatz ProTaq®Clear in Paraffin gebracht und mit dem Schlittenmikrotom in 4 µm dicke Schnitte zerlegt.

Nach Aufbringen der Schnitte auf Objektträger, Trocknung und Entparaffinierung in ProTaq®Clear (2 x 10 Minuten) und absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 70% Ethanol) erfolgte entweder eine kurze Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) oder eine Immunfärbung mit einem der in Materialliste und Ergebnisteil genannten Primärantikörper gegen COL5A1 bzw. die Integrine $\alpha\beta3$ oder $\alpha\beta5$. Die Verwendung des humanen Tumormaterials war von der zuständigen Ethikkommission zugelassen worden.

Für die H&E-Färbung wurden die in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 70% Ethanol) rehydrierten Schnitte 5 min in einer Hämatoxylin-Lösung (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) inkubiert, anschließend mit H₂O gespült und in einer 1 %-igen Salzsäure-Ethanol-Lösung kurz differenziert. Nach erneutem Spülen mit H₂O und Bläuen in heißem Leitungswasser erfolgte dann eine 3-minütige Färbung mit 1 %-iger Eosin-Lösung (zytoplasmatische Rotfärbung). Nach Spülen mit H₂O und erneuter aufsteigender Alkoholreihe wurden die Objektträger mit ProTaq®Clear behandelt und die Präparate mit Paramount eingedeckt.

Sollten stattdessen immunhistochemische Färbungen an den rehydrierten Paraffinschnitten gemacht werden, so erfolgte statt der H&E-Färbung nach Antigen-Demaskierung und Peroxidase-Blockierung der Schnitte eine Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper in der jeweils vom Hersteller für Immunhistochemie vorgesehenen Verdünnung und nachfolgende Visualisierung des Antigens mit Diaminobenzidin (DAB+, Dako, Hamburg, D).

3.25.7 Zwei-Photonen-Mikroskop *in vivo*

Wie in Absatz 3.25.2 beschrieben, wurden Nacktmäusen intrakraniell je Bohrloch 1 μ l PBS mit 1×10^5 IOMM-miR-145 Zellen bzw. IOMM-miRKO Zellen appliziert und am nächsten Tag unter einem Zwei-Photonen-Mikroskop (siehe Absatz 3.24) beobachtet. Dies war möglich, da die mit dem lentiviralen miR-145-Vektor bzw. dem korrespondierenden Kontrollvektor stabil transduzierten IOMM-Lee Zellen stabil das grüne Fluoreszenzprotein GFP exprimierten. Zunächst wurden die Tiere wieder i.p. mit einer Narkoselösung anästhesiert. Die weitere Anästhesierung erfolgte mit einer Minivent Beatmungspumpe für Mäuse (FMI, Seeheim-Ober Beerbach, D) mit Isofluran und dazu dosiertem Sauerstoff. Anschließend wurde die Maus in einem Rahmen mit Heizplatte befestigt, sodass sich die Atembewegungen verringerten und

die Körpertemperatur konstant blieb. Danach wurde die mit Gewebekleber verschlossene Kopfhaut wieder geöffnet, indem dieser Teil vorsichtig abgeschnitten wurde. Im Anschluss daran wurde der Schädelknochen mit Hilfe eines Dentalbohrers und einem entsprechenden Aufsatz (an den Stellen ca. 2 mm lateral der ursprünglichen Bohrlöcher) etwas dünner gefräst. Eine dünne Knochenschicht blieb jedoch erhalten, durch diese die Fluoreszenzmikroskopie in Bereichen geringer Tiefe unter der Schädeldecke *in vivo* möglich ist. Im Anschluss wurde der Bereich mit einem Wassertropfen benetzt und unter dem Zwei-Photonen-Mikroskop beobachtet. Die Blutgefäße wurden zuvor mit 100 µl Rhodamin B Dextran (10 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) durch retroorbitale Injektion markiert.

Des Weiteren fanden Beobachtungen am Zwei-Photonen-Mikroskop mit Mäusen statt, denen ein sogenanntes Fenster (rundes Deckglas, Durchmesser 5 mm, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) eingesetzt wurde. Zunächst wurde der Schädelknochen der Maus angeschliffen, gerade so weit, dass mithilfe des Zwei-Photonen-Mikroskops beobachtet werden konnte. Anschließend wurden die IOMM-miR-145 Zellen bzw. IOMM-miRKO Zellen direkt unter das Fenster gegeben und dieses oberhalb der Schädeldecke zwischen Bregma und Lambda platziert. Das Fenster wurde mit Zahnzement (Paladur, Heraeus Kulzer, Hanau, D) befestigt. Hier galt es zunächst erstmal die geeignete Zellzahl herauszufinden (angefangen mit 1 µl PBS mit 5000 Zellen bis hin zu 1 µl PBS mit 1000 Zellen). Nach 4 Tagen konnte die Maus das erste Mal unter dem Zwei-Photonen-Mikroskop beobachtet werden, da zu diesem Zeitpunkt das Deckglas nicht mehr beschlagen war. Weitere Beobachtungen fanden nach 7 und nach 12 Tagen statt.

3.26 Statistik

Sämtliche statistischen Tests und Berechnungen wurden mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 21, Armonk, NY, USA) durchgeführt (Signifikanzniveau $p \leq 0,05$). Bei der relativen Expression der Real-Time PCR wurden multiple Vergleiche mit Hilfe der Varianzanalyse (ANOVA) und anschließendem Tukey Post-Hoc Test durchgeführt. Der Mann-Whitney U-Test fand in den Vergleichen des Tumorwachstums der Mausmodelle zwischen den Zelllinien (IOMM-miR-145 und IOMM-miRKO) Anwendung. Ebenso wurde er genutzt zum Vergleich zwischen den Behandlungs- bzw. Kontrollgruppen (Behandlung mit Cilengitide bzw. physiologischer Kochsalzlösung). Des Weiteren fand der U-Test Anwendung bei der

Wirksamkeit der transienten pre-miR-145-Transfektion (IOMM pre-miR-145 versus pre-miR-Kontrolle). Der Korrelationskoeffizient nach Pearson diente der Auffindung linearer Korrelationen zwischen einzelnen Parametern. In den Abbildungen sind die Fehlerbalken als Standardabweichung (SD - standard deviation) oder Standardfehler des Mittelwertes (SEM - standard error of the mean) angegeben und jeweils gekennzeichnet.

Das kumulative Überleben von Versuchstieren und Kontrolltieren gegen die Zeit wurde in Form von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede in den Überlebenszeiten geschah mit dem Log-Rang-Test.

4 Ergebnisse

4.1 Verminderte *miR-145*-Expression in hochgradigen Meningeomen als Hinweis auf eine Tumorsuppressorfunktion

Die Menge an *miR-145* in Meningeomen sinkt mit dem Tumorgrad (siehe Abbildung 3). Dies ist ein wichtiger Hinweis für eine Tumorsuppressorfunktion.

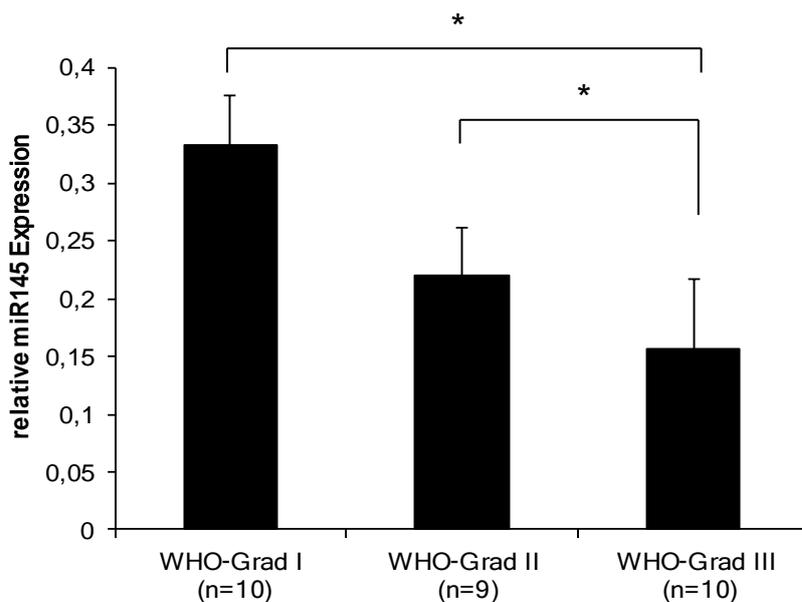


Abbildung 3: Differentielle Expression der *miR-145* zwischen den einzelnen Tumorgraden.

Nun erfolgte eine Suche nach Gründen für die Tumorgrad-Abhängigkeit der *miR-145*. Könnte es mit Allelverlusten im Bereich des chromosomalen Locus für das *miR-145*-Gen zu tun haben? Um diesen Sachverhalt zu klären, wurde eine LOH-Analyse (Loss of Heterozygosity) durchgeführt. Die LOH-Analyse erfolgte an 27 Meningeomen mit den dazugehörigen Blutproben, davon waren 15 WHO-Grad I, 10 WHO-Grad II und 2 WHO-Grad III. Es ergaben sich 17 informative Fälle, 8 nicht informative und 2 technische Ausfälle. Unter den 17 informativen Fällen waren 8 mit WHO-Grad I, 8 mit WHO-Grad II und 1 mit WHO-Grad III. Bei allen informativen Fällen lag kein LOH vor. Einige Beispiele für informative Fälle mit fehlendem LOH zeigen die Abbildung 4, 5 und 6 für den längenvariablen Marker-Locus D5S413 in unmittelbarer Nähe des *miR-145*-Gens. Demnach hat die Tumorgrad-Abhängigkeit der *miR-145* nichts mit chromosomalen Stückverlusten zu tun, da sich solche Stückverluste offenbar bei Meningeomen aller WHO-Grade selten ereignen. Sie waren zumindest im für die

vorliegende Arbeit verfügbaren Material in keinem Fall nachweisbar. Die malignen Meningeome des WHO-Grades III waren in dieser LOH-Analyse stark unterrepräsentiert, da kaum Tumormaterial verfügbar war. Für die in Abbildung 3 gezeigte RNA-Analyse waren zwar eigens zusätzliche RNA-Proben von der Neuropathologie Düsseldorf (siehe Absatz 2.2) zur Verfügung gestellt worden, jedoch kein für die DNA-Extraktion notwendiges Gewebe.

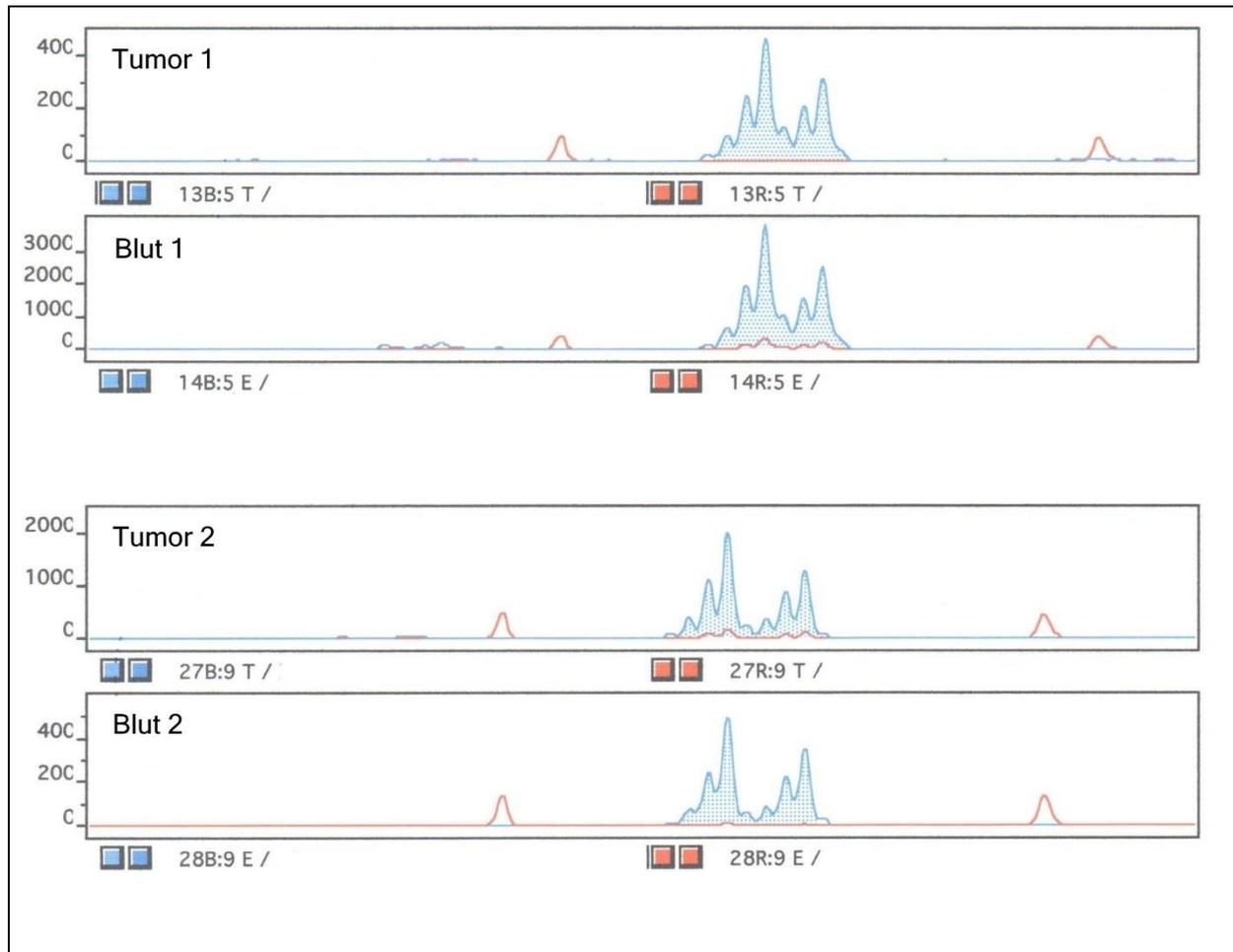


Abbildung 4: LOH-Analyse im *miR-145*-Locus; WHO-Grad I.

Die blaugepunkteten Peaks repräsentieren die Allele des analysierten längenpolymorphen Markers, die roten Peaks zeigen Längenstandards der Kapillarelektrophorese an. Die X-Achse gibt die Auftrennung nach Fragmentlängen wieder, sodass bereits optisch an den untereinander liegenden Peaks von Tumor (T) und EDTA-Blut (E) erkennbar ist, dass im Tumor beide konstitutiven Allele des Patienten erhalten geblieben sind. Die Software weist die Allele allerdings auch mit exakter Länge aus (nicht dargestellt). Y-Achse: relative Fluoreszenz-Einheiten.

Dennoch kann eine Bedeutung chromosomaler Stückverluste für die Absenkung der *miR-145*-Expression in atypischen Meningeomen (WHO-Grad II) mit einiger Sicherheit ausgeschlossen werden. Für die malignen Tumoren gibt es zumindest keinen Hinweis auf eine Beteiligung von LOH, was wiederum zu zytogenetischen Befunden in der Literatur passt, die den relevanten Arm von Chromosom 5 nicht als Schwerpunkt für Deletionen ausweisen (siehe Diskussionspunkt 5.1.3).

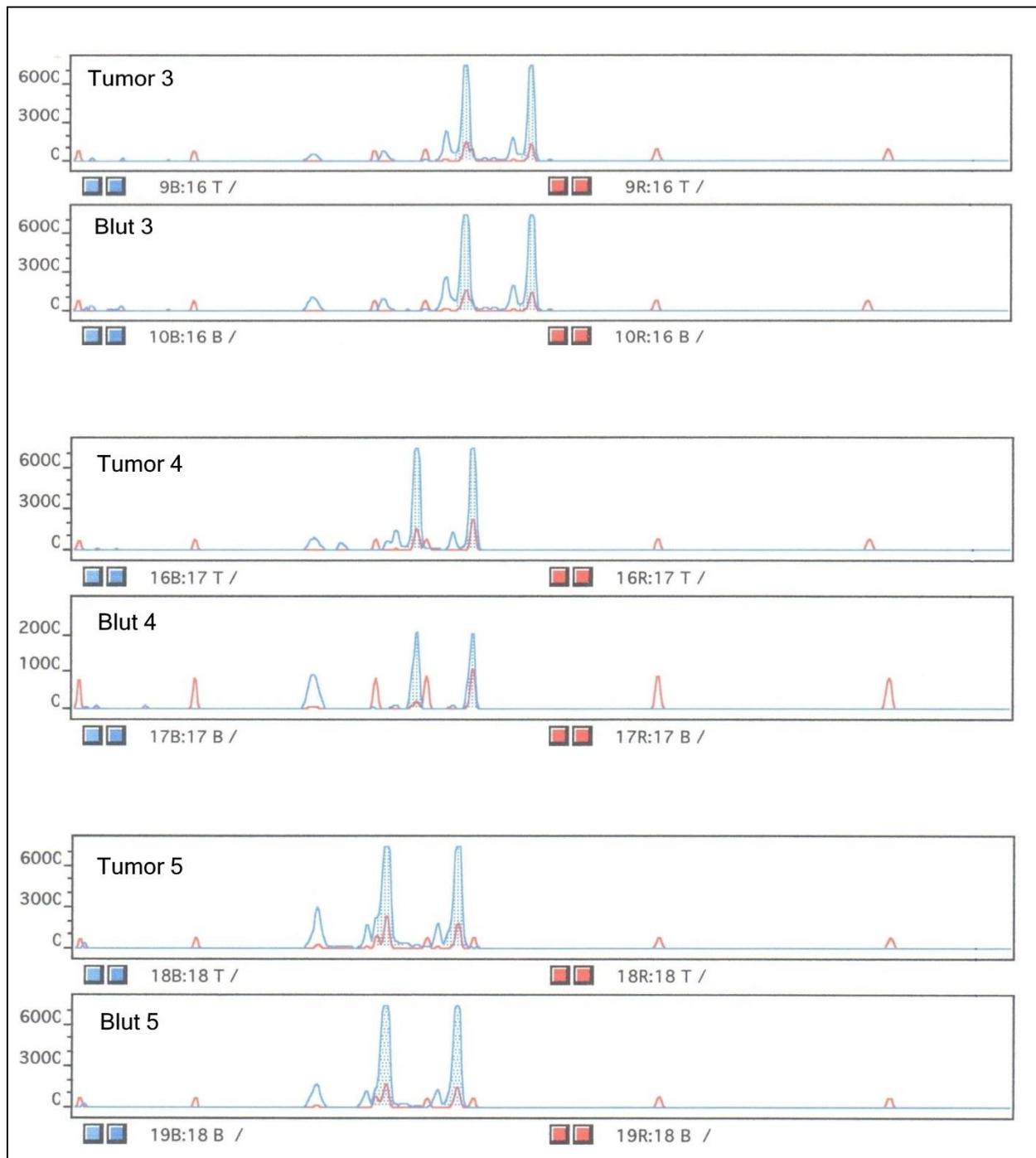


Abbildung 5: LOH-Analyse im *miR-145*-Locus; WHO-Grad II.
Erläuterungen siehe Abbildung 4.

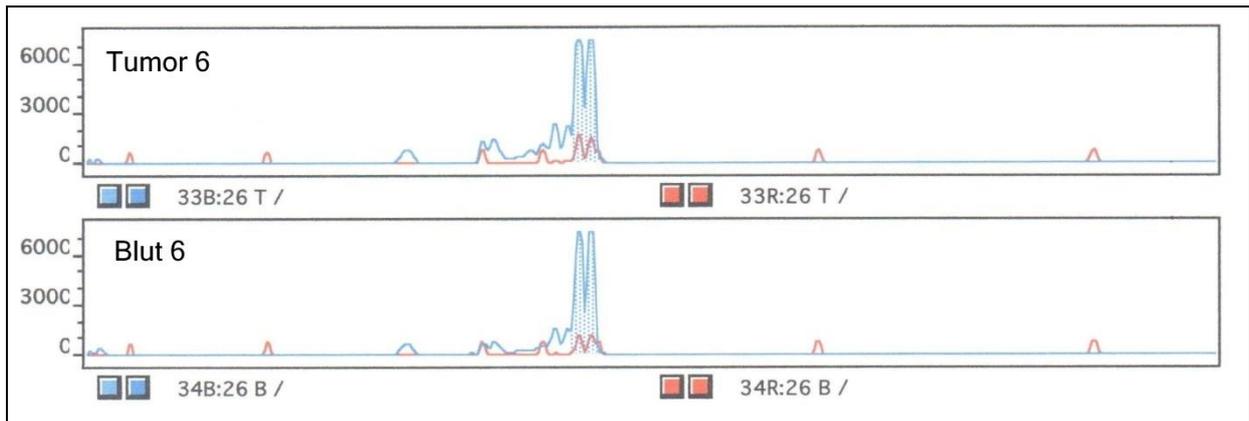


Abbildung 6: LOH-Analyse im *miR-145*-Locus; WHO-Grad III.
Erläuterungen siehe Abbildung 4.

Es stellte sich nun die Frage nach epigenetischen (nicht auf DNA-Ebene angesiedelten) Regulationsmechanismen des *miR-145*-Gens. Eine denkbare Möglichkeit ist dabei, die Regulation der Transkription über Transkriptionsfaktoren. Untersucht wurde daher die Expression und posttranslationale Modifikation (Phosphorylierung) des Transkriptionsfaktors C/EBP- β (CCAAT/enhancer binding protein beta), der als Repressor der *miR-145*-Expression agieren kann (Sachdeva et al. 2012). Es zeigte sich zunächst, dass die reine mRNA-Verfügbarkeit dieses Transkriptionsfaktors in der Serie humaner Meningeome aller WHO-Grade keine Verteilung aufwies, die als Erklärung der beobachteten sukzessiven *miR-145*-Verminderung von Grad I über Grad II zu Grad III in Frage käme (siehe Abbildung 7).

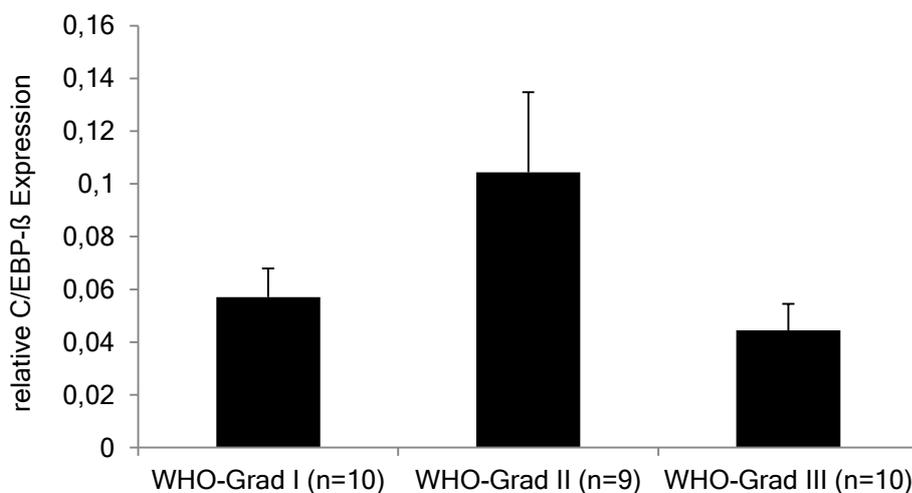


Abbildung 7: C/EBP- β -mRNA in Meningeomen.

Auf Ebene der Proteinverfügbarkeit des Transkriptionsfaktors (siehe Abbildung 8) hätte man ggf. einen Zusammenhang zu *miR-145* vermuten können, jedoch war die für Western Blots verfügbare Anzahl hochgradiger Tumoren naturgemäß zu klein, um die notwendigen Fallzahlen zu analysieren. Die mRNA des Transkriptionsfaktors C/EBP- β kann potentiell in drei unterschiedliche Proteine translatiert werden, infolge von drei unterschiedlichen Initiations-Codons in der mRNA. Sie werden in der Literatur bezeichnet als Full (LAP*, LAP1, Leber-aktivierende Protein 1) mit einem Molekulargewicht von 38 kDa, LAP (LAP2) mit einem Molekulargewicht von 35 kDa und LIP (Leber-inhibierende Protein, 20 kDa). LIP ist im Vergleich zu den aktivierenden Isoformen schwach exprimiert (siehe Abbildung 8).

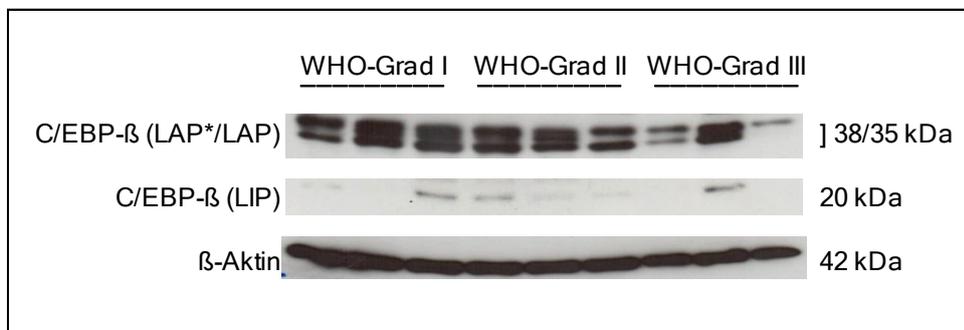


Abbildung 8: C/EBP- β -Protein in Meningeomen.

Da nicht allein die Menge des Transkriptionsfaktors über die Genaktivierung entscheidet, sondern ebenfalls die posttranslationale Regulation seiner Aktivität, wurde zudem der Phosphorylierungszustand von C/EBP- β per Western Blot analysiert. Die Phosphorylierung von C/EBP- β an verschiedenen Positionen stimuliert seine Transkriptionsaktivität (Wegner et al. 1992). Der Phospho-C/EBP- β (Thr235) Antikörper detektiert das endogene Level des menschlichen LAP*/LAP nur, wenn es bei Thr235 phosphoryliert wird und LIP nur, wenn es bei Thr37 phosphoryliert wird (Marcinkowska et al. 2006; Esteves et al. 2014). Tatsächlich schien sich ebenso hier ein Zusammenhang mit der abnehmenden *miR-145*-Expression in hochgradigen Meningeomen abzuzeichnen (siehe Abbildung 9). Allerdings wird dieser Befund eingeschränkt durch die naturgemäß geringe Anzahl hochgradiger Tumoren, von denen ungenügend Material für Western Blots zur Verfügung stand.

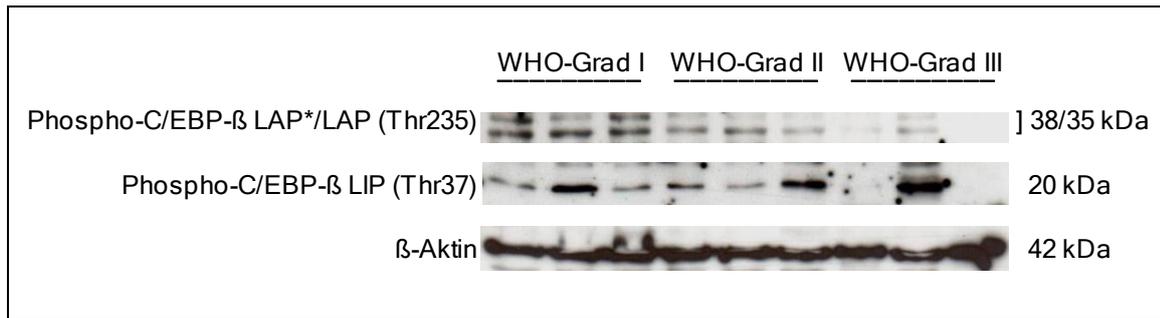


Abbildung 9: Phosphorylierung von C/EBP-β-Protein in Meningeomen.

Trotz der verbleibenden Unklarheit über den genauen Mechanismus, erscheint eine epigenetische Ursache für den *miR-145*-Verlust in hochgradigen Tumoren letztlich wahrscheinlicher als eine genetische, weil die einfachste denkbare Ursache auf DNA-Ebene (chromosomale Stückverluste) als relevanter Faktor in der analysierten Tumorserie ausgeschlossen werden konnte. Wichtigstes Resultat der Untersuchungen des humanen Materials war die klare Tumorigrad-Abhängigkeit der *miR-145*. Diese war zweimal an unabhängigen Tumorserien gefunden worden (Kliese et al. 2013).

Neben dem klar über die Aggressivität eines Meningeoms entscheidenden Tumorigrad gerät in den letzten Jahren immer mehr der bei Meningeomen so oft inaktivierte Tumorsuppressor *NF2*/Merlin in Verdacht, ebenso für biologische Eigenschaften der Tumoren relevant zu sein, die einen Einfluss auf die Prognose ausüben könnten. Zu diesen Eigenschaften gehören vor allem Motilität, Substratanheftung, Zell-Zell-Kontakte, Zellmorphologie, Focus-Bildung und Invasivität der Tumorzellen (James et al. 2008), die nach *in vitro* gewonnenen Vorbefunden der eigenen Arbeitsgruppe (Kliese et al. 2013) von *miR-145* beeinflusst zu werden scheinen. *MiR-145* hat Effekte in Bezug auf Migration und Invasion (Gap Assay und Transwell Assay) und die Zellmorphologie (Bildung von Filopodien) und ebenfalls in Bezug auf Koloniebildung in Agar (vergleichbar mit der Focus-Bildung in Kulturen nach *NF2*-Verlust). Aus diesem Grunde wurde am humanen Material überprüft, ob sich möglicherweise eine Verbindung aufzeigen lässt zwischen *NF2* und *miR-145*. Obwohl eine Inaktivierung von *NF2* durch Verlust eines Allels prinzipiell in allen Tumorigraden vorkommt, sollte diese Analyse ausschließen, dass an einer Tumorserie begrenzter Größe eine Assoziation dieses wichtigen Tumorsuppressors mit *miR-145* übersehen wurde. Die Betrachtung der mRNA-Level von *NF2* in der Meningeomserie macht eine wesentliche Interaktion von Merlin mit dem *miR-145*-

Gen unwahrscheinlich, weil keine parallelen oder antiparallelen Verläufe zu *miR-145* erkennbar sind, sondern in der betrachteten Serie die atypischen Meningeome (WHO-Grad II) die höchste mRNA-Konzentration für *NF2* aufweisen (siehe Abbildung 10).

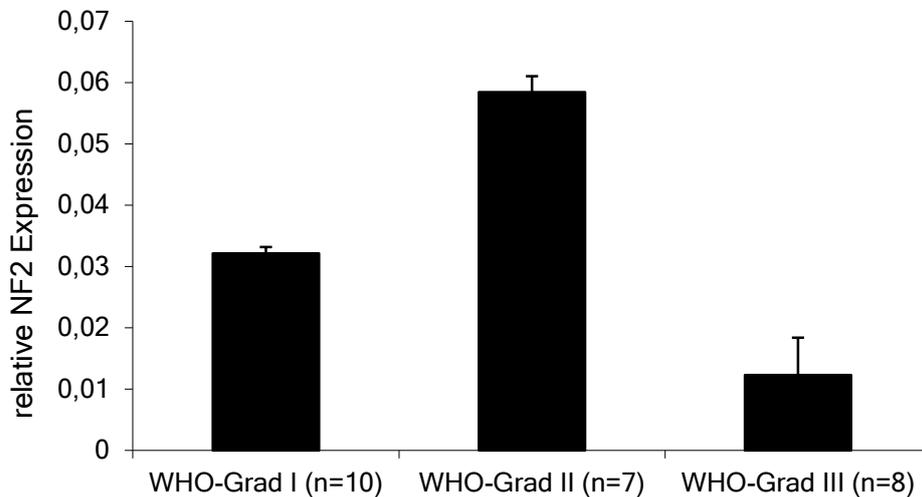


Abbildung 10: *NF2*-mRNA in Meningeomen.

4.2 Rekonstitution der *miR-145*-Expression in malignen Meningeomzellen zur Analyse der Wirkungen dieser miRNA

In der Arbeitsgruppe existierten zu Beginn der hier vorgelegten Doktorarbeit bereits Daten aus Experimenten *in vitro*, die auf eine moderate Proliferationshemmung, vor allem aber auf verminderte Motilität, Substratanheftung und Invasionsfähigkeit nach transienter Rekonstitution einer mangelnden *miR-145*-Expression in malignen Meningeomzellen hindeuteten. Aus diesem Grunde wurden noch einige Experimente mit ebensolcher transienter Transfektion maligner Meningeomzellen (IOMM-Lee) mit *miR-145*-Oligonukleotiden angeschlossen. Vor allem jedoch wurden IOMM-Lee-Zellen stabil lentiviral mit dem humanen *miR-145*-Gen (bzw. Kontrollvektor) transduziert mit dem Ziel, detaillierte Analysen zur Wirkung der *miR-145* in malignen Meningeomzellen durchführen zu können. Bei diesen in den Folgekapiteln geschilderten Analysen ging es zunächst um Bestätigung oder Widerlegung der Tumorsuppressorfunktion der *miR-145* am Tiermodell und danach um die Auffindung potenziell von *miR-145* regulierter Gene, welche einen Teil dieser Wirkung vermitteln könnten.

Es erfolgten sowohl transiente Transfektion maligner Meningeomzellen (IOMM-Lee, sehr geringer endogener *miR-145*-Level) mit *miR-145* in Form stabilisierter Oligonukleotide, als auch stabile lentivirale Transfektionen der IOMM-Lee-Zellen mit dem *miR-145*-Gen. Die Abbildung 11 zeigt zunächst die Wirksamkeit der beiden Transfektionen auf die beabsichtigte Erhöhung der *miR-145*-Level.

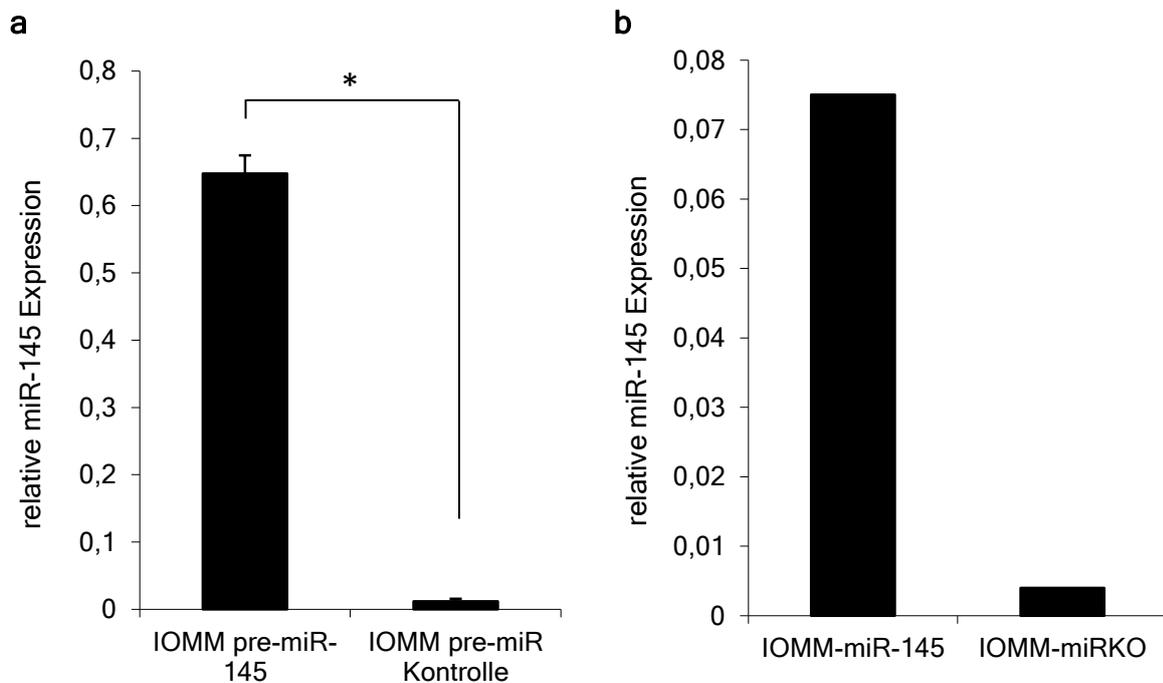


Abbildung 11: a - Wirksamkeit der transienten pre-miR-145-Transfektion. b - Wirksamkeit der stabilen *miR-145*-Transduktion.

Bei der transienten pre-miR-145-Transfektion (jeweils vier verschiedene Zellkulturpassagen IOMM pre-miR-145 und IOMM pre-miR Kontrolle) ergab sich im Mann-Whitney U-Test, dass die Differenz signifikant ist mit $p \leq 0,05$ (*) (vgl. Abbildung 11a). Für die stabile Transfektion ist lediglich ein Beispiel von nur einer Zellkulturpassage gezeigt, von aber insgesamt zwei unabhängigen lentiviralen Transfektionen. Daher gibt es keine eingezeichnete Standardabweichung. Die hier gezeigte *miR-145*-Induktion liegt bei etwa dem 18-fachen des endogenen Levels in der Kontrolltransfektion mit Leervektor (siehe Abbildung 11b). Unabhängig von Transfektionsdatum und Passagezahl lag diese Induktionsrate jedoch immer im Bereich von 15- bis 30-fach bis hin zu hohen Passagezahlen (50). Die über lange Zeit in sehr vielen Passagen vorliegende stabile Überexpression konnte zum einen per Real-Time PCR und zum anderen zusätzlich mit cDNA Arrays bestätigt werden, die

als Nebenprodukt eine ca. 34-fache erhöhte Expression der *miR-145* auswies. Die Durchführung dieser cDNA Arrays, welche als unabhängige Methode die erhöhte Expression bestätigten, erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. rer. nat. habil. Uwe Lendeckel (Institut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität Greifswald).

Diese syngenen Zellpaare differentieller *miR-145*-Expression wurden vor ihrem Einsatz im Tiermodell zunächst noch dazu genutzt, einen letzten Aspekt abzuklären, der im oben Beschriebenen offen geblieben war. Dies ist die Frage, ob möglicherweise umgekehrt *miR-145* an der Transkriptionsregulation von *NF2* beteiligt sein könnte. Das ist durch die fehlende Korrelation beider RNAs am humanen Material keineswegs ausgeschlossen, weil bekannt ist, dass für die Kopienzahl der *NF2*-mRNA ebenso andere Faktoren wichtig sind, wie die sehr häufigen Verluste eines Allels. Die Mitbeteiligung von *miR-145* an der Regulation von *NF2*/Merlin war demnach nicht auszuschließen. Bei der Untersuchung der *NF2*-mRNA konnte weder die Rekonstitution von *miR-145* die Kopienzahl der *NF2*-Transkripte signifikant erhöhen, noch war ein Effekt in der dauerhaften (stabilen) Transfektion mit *miR-145* ersichtlich (siehe Abbildung 12). Es konnte somit nicht auf einen Regulationszusammenhang zwischen *miR-145* und *NF2* geschlossen werden. Das Fehlen dieses Zusammenhangs wurde auf Proteinebene bestätigt (siehe Abbildung 13).

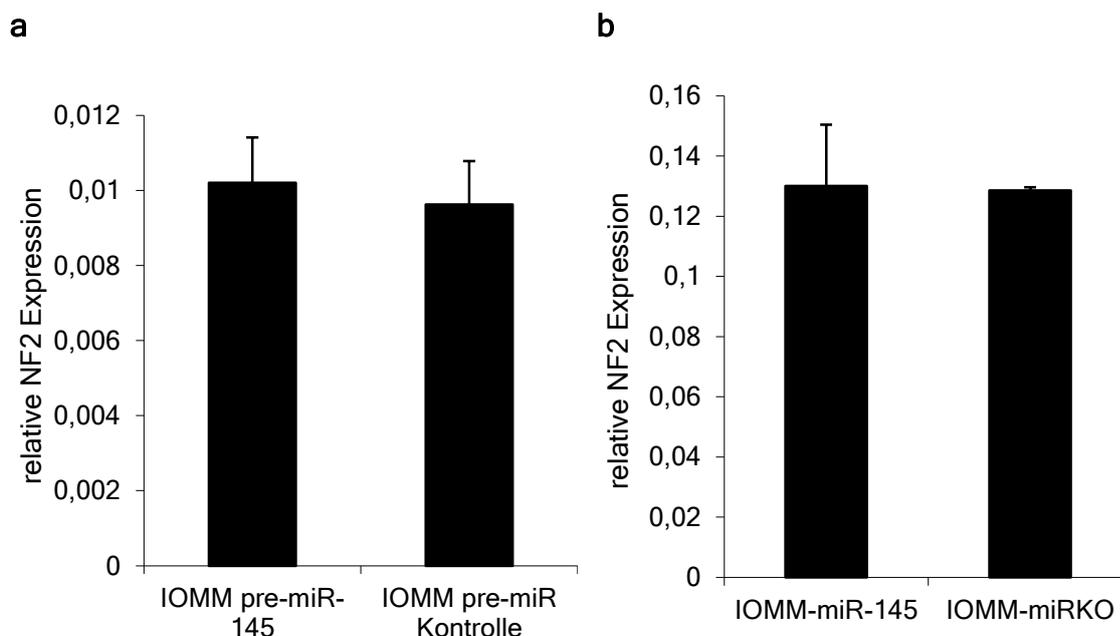


Abbildung 12: **a** - Wirkung der transienten pre-miR-145-Transfektion auf *NF2*-mRNA. **b** - Wirkung der stabilen *miR-145*-Transduktion auf *NF2*-mRNA.

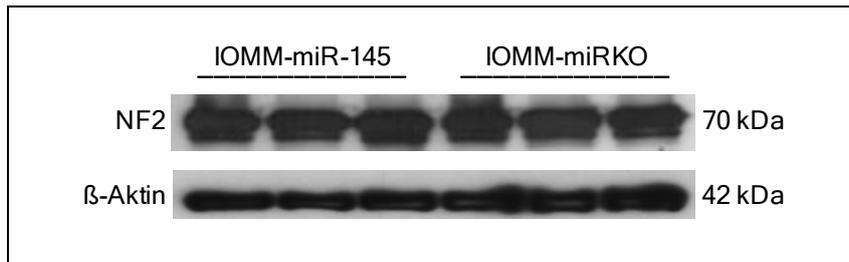


Abbildung 13: Wirkung der stabilen *miR-145*-Transduktion auf das NF2-Protein.

4.3 *MiR-145* wirkt als moderater Tumorsuppressor *in vivo*

Das Tumorwachstum der IOMM-miR-145 und IOMM-miRKO Zellen wurde *in vivo* anhand von zwei verschiedenen Mausmodellen untersucht, zum einen im subkutanen und zum anderen in einem orthotopen intrakraniellen Mausmodell.

Zunächst wurden die jeweiligen Zellen zu beiden Seiten subkutan im Nackenbereich der Nacktmaus injiziert. Die Tumoren wurden an Tag 7 und Tag 14 mithilfe eines Messschiebers vermessen (entsprechende Daten siehe Abbildung 14). Ein Größenunterschied zwischen den Tumoren der IOMM-miR-145 und IOMM-miRKO Zellen ist sichtbar, jedoch nicht signifikant.

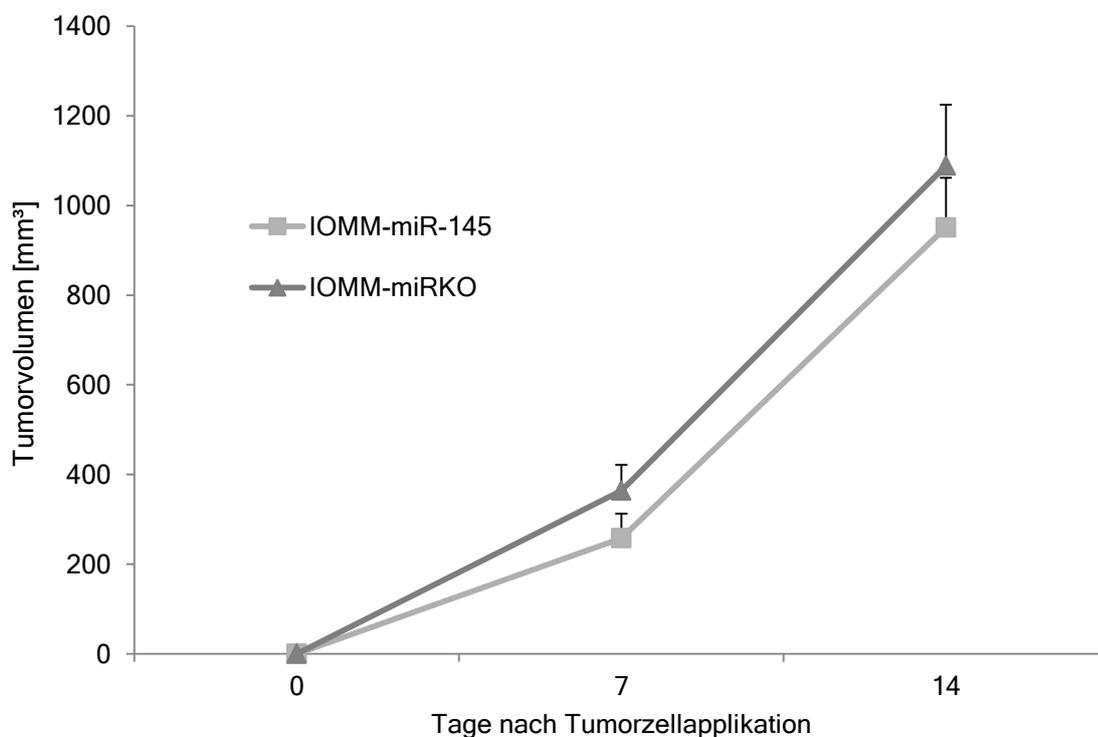


Abbildung 14: Einfluss von *miR-145* auf Tumorzellenkurve (subkutan).

Des Weiteren erfolgte im zweiten Mausmodell eine intrakranielle Applikation der Zellen in den Subarachnoidalraum der Nacktmaus, um der humanen Umgebung so nah wie möglich gerecht zu werden. In der Abbildung 15 sind die mittleren Tumorzellvolumina, die mithilfe des MRT gewonnen werden konnten, an Tag 7 und Tag 14 dargestellt. Am 7. Tag nach der Tumorzellapplikation ergab das mittlere Tumorzellvolumen der Mäuse mit IOMM-miR-145 Zellen $6,49 \text{ mm}^3 \pm 0,37 \text{ mm}^3$ (SEM) und der Mäuse mit IOMM-miRKO Zellen $15,21 \text{ mm}^3 \pm 2,03 \text{ mm}^3$ (SEM). Die Differenz ist im U-Test signifikant mit $p \leq 0,01$ (**). Am 14. Tag betrug das mittlere Tumorzellvolumen mit IOMM-miR-145 Zellen $41,97 \text{ mm}^3 \pm 4,06 \text{ mm}^3$ (SEM) und mit IOMM-miRKO Zellen $60,52 \text{ mm}^3 \pm 4,57 \text{ mm}^3$ (SEM). Unter Verwendung des U-Tests ist die Differenz in diesem Fall ebenfalls signifikant, jedoch mit $p \leq 0,05$ (*). Obwohl die entsprechenden Kurven in der Publikation (Kliese et al. 2013) vergleichbar waren, ergab sich damals noch kein statistisch signifikanter Unterschied im Verhalten der beiden Genotypen. Signifikanz stellte sich erst ein durch eine Aufstockung der Gruppengrößen nach Erscheinen der Publikation.

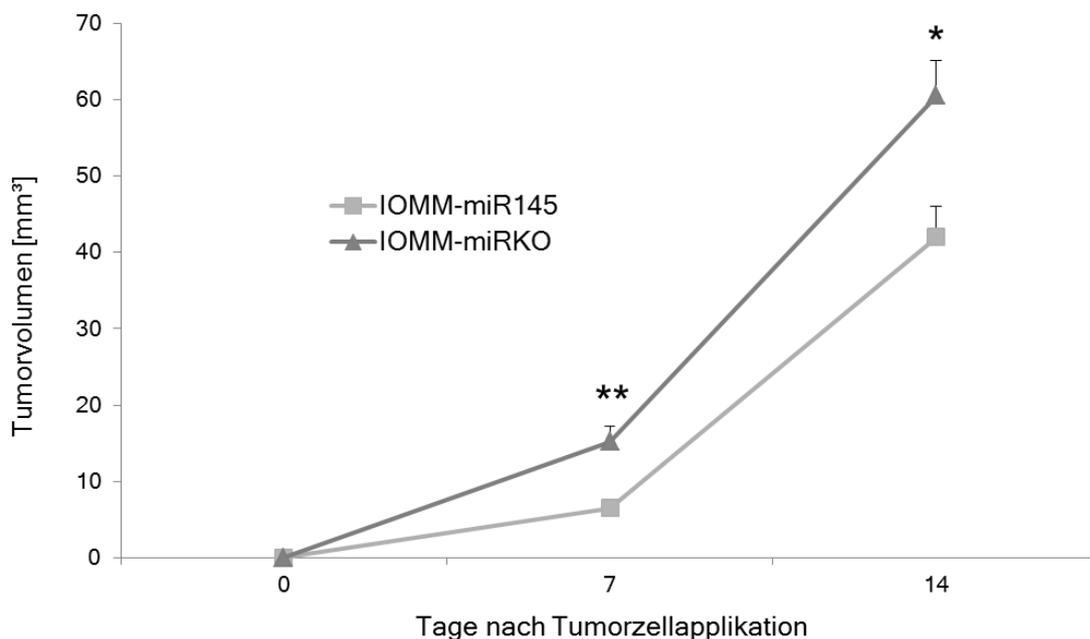


Abbildung 15: Einfluss von *miR-145* auf Tumorzellvolumenkurve (orthotop).

Das Tumorzellwachstum im Subarachnoidalraum ist in der Abbildung 16 zu erkennen (jeweils mit Pfeilen markiert). Am 7. Tag ist gut sichtbar, dass das Tumorzellvolumen der IOMM-miRKO Zellen größer ist, als das der IOMM-miR-145 Zellen. An Tag 14 ist der Größenunterschied des Tumorzellvolumens nicht mehr so enorm, aber dennoch

erkennbar. Die histologische Untersuchung des subarachnoidalen Tumorwachstums ergab bei IOMM-miR-145 (siehe Abbildung 17a) und IOMM-miRKO (siehe Abbildung 17b) ein deutliches orthotopes Tumorwachstum. Jedoch zeigte sich bei IOMM-miRKO eine erhöhte zungenartige Infiltration (siehe Abbildung 17d) im Vergleich zu IOMM-miR-145 (Abbildung 17c).

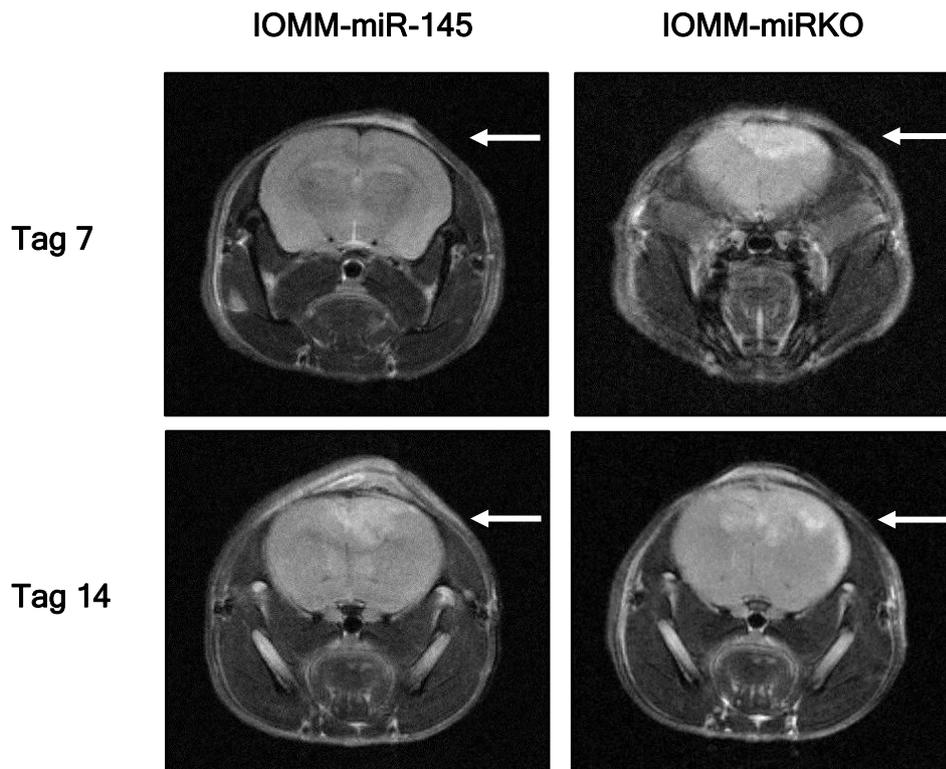


Abbildung 16: MRT-Aufnahmen, axiale Schnittebene.

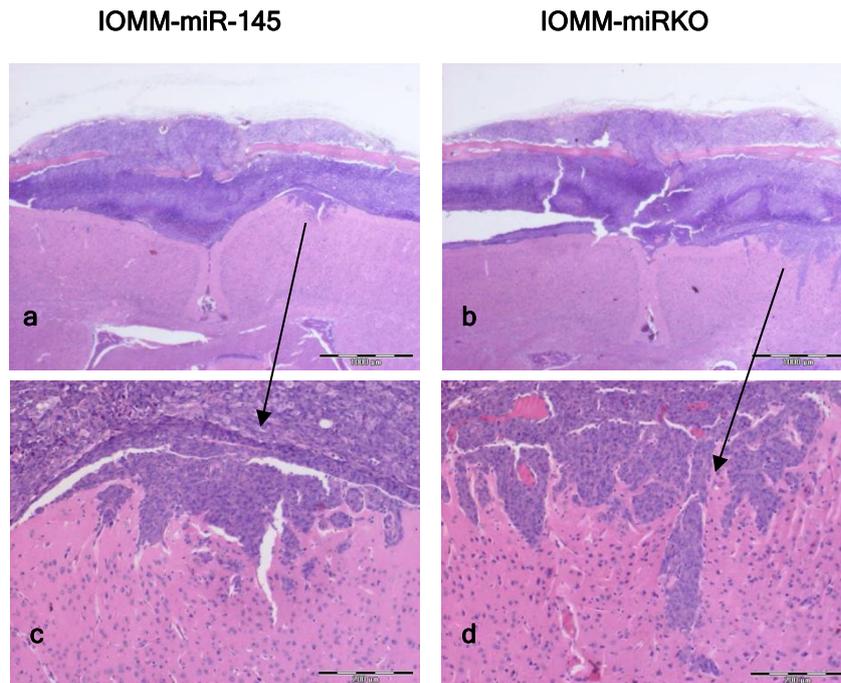


Abbildung 17: Histologische Analyse des subarachnoidalen Tumorwachstums in der Maus.

Die stabile Rekonstitution der *miR-145*-Expression in der malignen Meningeomzelllinie IOMM-Lee hemmt im subkutanen und im orthotopen Xenograft-Modell die Wachstumskinetik des Tumors. Die nachweisbare Wirkung dieses Tumorsuppressors ist im orthotopen Modell in der MRT-basierten Tumorummetrie statistisch signifikant.

4.4 Einfluss von *miR-145* auf die Tumorzellmigration *in vivo* und an hippocampalen Schnittkulturen

In einem weiteren Experiment wurden Nacktmäusen orthotop intrakraniell Zellen injiziert und am nächsten Tag unter einem Zwei-Photonen-Mikroskop beobachtet, wie in Absatz 3.25.7 beschrieben. Dafür besteht die Möglichkeit Blutgefäße und Tumorzellen parallel anzufärben und für die Zwei-Photonen-Mikroskopie sichtbar zu machen. Die Blutgefäße sind mithilfe von Rhodamin B Dextran rot markiert und die IOMM-miR-145 und IOMM-miRKO Zellen sind grün fluoreszierend (GFP). Die Abbildung 18b zeigt eine jeweilige Momentaufnahme eines Films, bei dem einer Maus IOMM-miRKO Zellen appliziert worden. Es konnten in einiger Entfernung zum Bohrloch Zellen beobachtet werden. Daher wurde eine Möglichkeit eröffnet, nachzuweisen, ob und in welcher Zeit die Zellen zu den Gefäßen, die als potenzielle

migratorische Leitstrukturen dienen, hinwandern und ob es diesbezüglich Unterschiede zwischen IOMM-miR-145 und IOMM-miRKO Zellen gibt. Aufgrund des großen Aufwands der Zwei-Photonen-Mikroskopie am Tier war Letzteres im Rahmen der vorliegenden Dissertation nicht möglich. Es blieb somit bei der grundsätzlichen Etablierung des Modells bezüglich einzusetzender Zellzahl und den Beobachtungsintervallen.

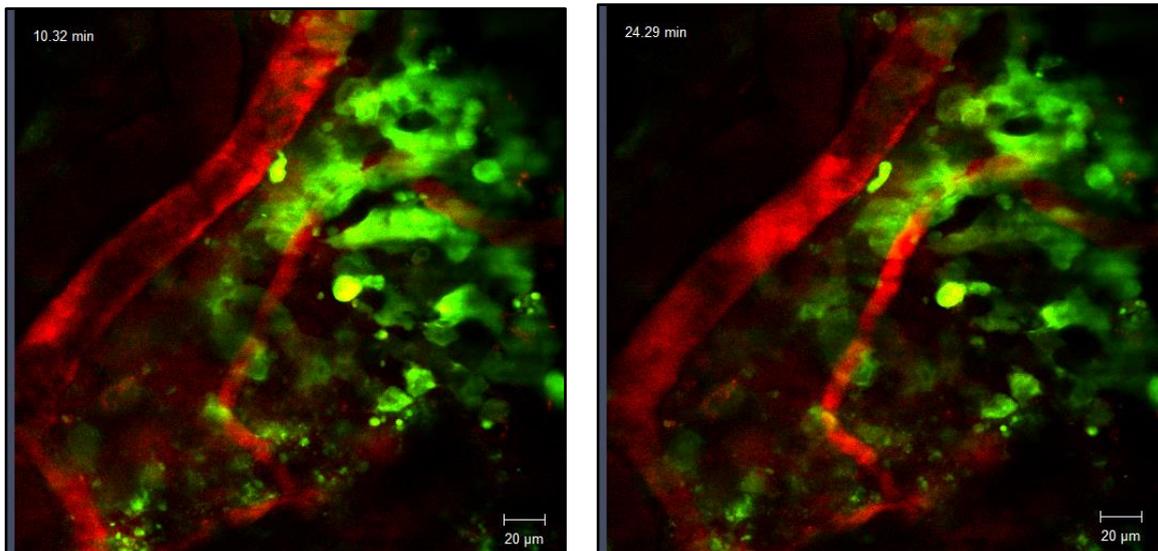
a**b**

Abbildung 18: **a** - Versuchsaufbau für Zwei-Photonen-Mikroskopie mit Nacktmaus; **b** - Filmausschnitte 1 Tag nach der Tumorzellapplikation (Maßstabsbalken entspricht 20 μm).

Die Möglichkeit die Migration in der Nähe von Gefäßen zu beobachten, stößt schnell an ihre Grenzen, da nur zu einem Zeitpunkt beobachtet werden kann, weil die Maus nach der Beobachtung mit dem Zwei-Photonen-Mikroskop mit entfernter Schädeldecke nicht länger lebensfähig ist. Da es aber ebenso interessant ist, die

Maus über einen längeren Zeitraum zu beobachten, wurde noch eine weitere Technik getestet. Bei dieser Technik wurde der Schädelknochen einer Maus soweit angeschliffen, dass die Möglichkeit besteht, mithilfe des Zwei-Photonen-Mikroskops zu beobachten. Unmittelbar nach dem dünnen Anschleifen des Schädelknochens wurden die Zellen direkt unter ein Fenster (ein Deckglas mit dem Durchmesser 5 mm) gegeben, da sie sehr schnell proliferieren. Dieses Fenster wurde im Anschluss daran mit Zahnzement befestigt. Nach 4 Tagen konnte das Tier das erste Mal mit dem Zwei-Photonen-Mikroskop beobachtet werden. Die nächsten Beobachtungen erfolgten nach 7 und 12 Tagen. Zunächst musste eine Zellzahl gefunden werden, bei der nach 7 Tagen ausreichend Zellen zu beobachten waren, jedoch nicht nur ein grüner Zellrasen sichtbar war. Als geeignet stellten sich 1 μ l PBS mit 1000 Zellen heraus. Als Beispiel ist in der Abbildung 19 gezeigt, wie ein Tumorzellverband, 7 Tage nach dem 1 μ l PBS mit 1000 IOMM-miRKO Zellen unter ein Fenster gegeben wurden, aussieht. Die Ausdehnungen des Tumorzellverbands lassen sich mit dieser Technik in allen drei Raumachsen vermessen. Für die 3D Rekonstruktion wurde die Volocity 3D Image Analysis Software (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) genutzt. Mithilfe der Software lässt sich ein gewählter Bereich virtuell drehen und es besteht die Möglichkeit in jeder Achse die Ausdehnung anhand eines Koordinatensystems zu vermessen. Nächster Schritt wäre es, die Zellen in eine definierte Stelle zu injizieren, um anschließend die mögliche Migration der Zellen genauer beobachten zu können. Es wurde zunächst eine Grundlage für eine Methode geschaffen, die es ermöglicht, Zellen in einer gewissen Entfernung vom Injektionsort über einen längeren Zeitraum *in vivo* mikroskopieren zu können, um darauf später einmal einen technisch ausgefeilten Migrationstest *in vivo* ableiten zu können, der zu dem noch nach Gefäßen als potentiellen Leitstrukturen der Migration schaut. Die Beobachtungen am Zwei-Photonen-Mikroskop zur Messung von Migrationsvorgängen und einer potentiellen Gefäß-Assoziation, war eine zum Ende der Doktorarbeit im Aufbau begriffene Technik, die aus Zeitgründen nicht mehr zum Vergleich von IOMM-miR-145 und IOMM-miRKO Zellen eingesetzt wurde.

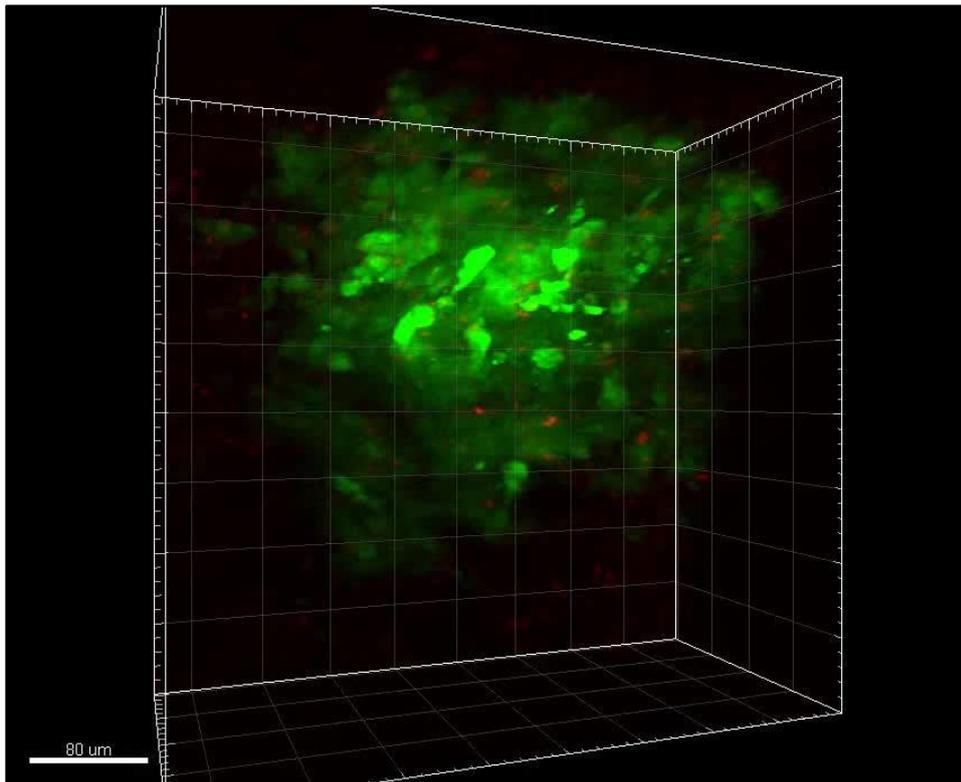


Abbildung 19: 3D Rekonstruktion des Tumorzellverbands (Maßstabsbalken entspricht 80 µm).

Des Weiteren wurden die grün fluoreszierenden IOMM-miR-145 und IOMM-miRKO Zellen auf organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (OHC) kultiviert und mithilfe des Zwei-Photonen-Mikroskops jeweils nach 24 und 48 Stunden beobachtet. Die Abbildung 20 zeigt, dass IOMM-miR-145 Zellen, im Vergleich zu den IOMM-miRKO Zellen, längere zytoplasmatische Fortsätze haben und ein feineres fibrilläres Netzwerk ausbilden. Obwohl in den OHC-Experimenten ein Einfluss von *miR-145* auf die Morphologie der Meningeomzellen beobachtet wurde, war eine klare Invasionshemmung nicht zu beweisen, weil die Bewegung von Tumorzellen in die Tiefe des Schnittes hinein selbst im Zeitraffer nur selten beobachtbar und daher nicht sinnvoll quantifizierbar war. Zudem waren nur kurze Beobachtungszeiträume möglich wegen der offensichtlichen Toxizität der Co-Kultivierung, nicht nur für die OHCs, sondern ebenso für die Tumorzellen (schlechter Medienkontakt unvermeidlich auf der Oberseite der OHCs).

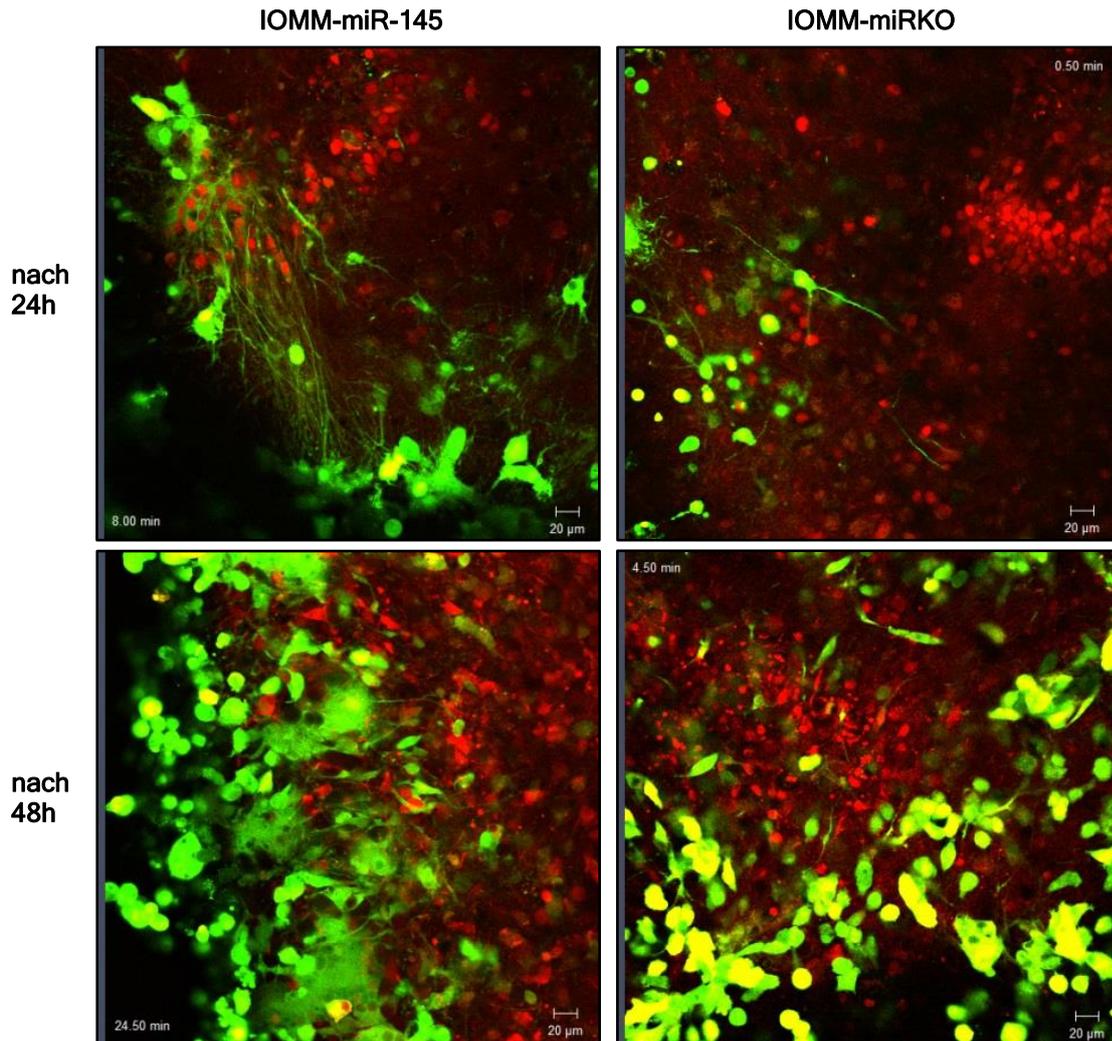


Abbildung 20: IOMM-miR-145 und IOMM-miRKO Zellen 24 bzw. 48 Stunden auf OHC kultiviert.

Da aber ebenfalls *in vitro* in der Arbeitsgruppe bereits einige Hinweise auf eine Migrations-Assoziation (Gap Assay und Transwell Assay) und Koloniebildung in Agar und die Zellmorphologie (Bildung von Filopodien) der *miR-145* gefunden worden waren (Kliese et al. 2013), erfolgte im Folgenden eine Suche nach potenziell durch *miR-145* regulierten Migrations-assoziierten Genen.

4.5 Durch *miR-145* regulierte Motilitäts-assoziierte Gene

Mittels eines PCR-Arrays mit 84 Motilitäts- und Invasions-assoziierten Genen wurde nach entsprechenden Genen gesucht, die zwischen den stabil mit *miR-145* transfizierten IOMM-Lee-Zellen und den Vektorkontrollen differentiell exprimiert waren. Dabei zeigten fast alle Gene (inklusive 5 Referenzgenen) eine nahezu perfekte quantitative Übereinstimmung der mRNA-Mengen zwischen beiden

Zelltypen. Moderate Differenzen zeigten sich nur für fünf Gene. Die stärkste Differenz betraf *COL5A1* im Sinne einer niedrigeren Expression in den *miR-145*-transfizierten Zellen (vgl. Abbildung 21). Diese Suchstrategie unterliegt der Einschränkung, dass grundsätzlich nur die Regulation auf Ebene der Transkription bzw. mRNA-Stabilität untersucht wird, während die sicher ebenfalls sehr wichtige Suppression der Translation durch miRNAs unbeachtet bleibt.

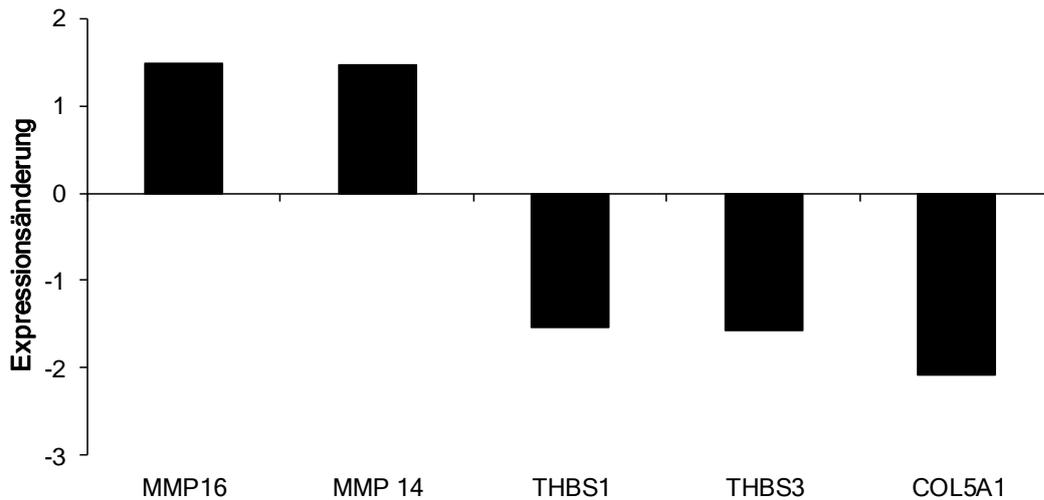


Abbildung 21: Relative Expressionsänderung Array.

Die relativen Änderungen bei der Zelllinie IOMM-miR-145 in Bezug auf IOMM-miRKO sind als Referenz dargestellt. Ein negatives Vorzeichen bedeutet somit eine verminderte Expression in *miR-145*-rekonstituierten Zellen. *MMP16* = Matrix metalloproteinase 16; *MMP14* = Matrix metalloproteinase 14; *THBS1* = Thrombospondin 1; *THBS3* = Thrombospondin 1; *COL5A1* = Collagen, type V, alpha 1.

Kollagen Typ 5 (*COL5A1*) ist als Katalysator der Kollagen-Fibrillenbildung auch für Motilität von Zellen in kollagenhaltigen Matrizen wesentlich und kommt ebenfalls in Meningeomen vor. Theoretisch könnte der Verlust des Tumorsuppressors *miR-145* in hochgradigen Meningeomen dazu führen, dass dieses Migrations-assoziierte Kollagen stärker exprimiert wird. Daraufhin wurde zunächst per Real-Time PCR überprüft, ob sich ein kontinuierlicher Anstieg der *COL5A1*-mRNA mit steigendem Tumorgrad in der Tumorserie zeigte. Dies war tatsächlich der Fall (siehe Abbildung 22) bei signifikanten Gruppen-Differenzen.

Mit den anderen Zielgenen (*MMP16*, *MMP14*, *THBS1* und *THBS3*) wurde ebenfalls eine jeweilige Real-Time PCR durchgeführt, jedoch zeigten sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen WHO-Graden (Daten nicht gezeigt).

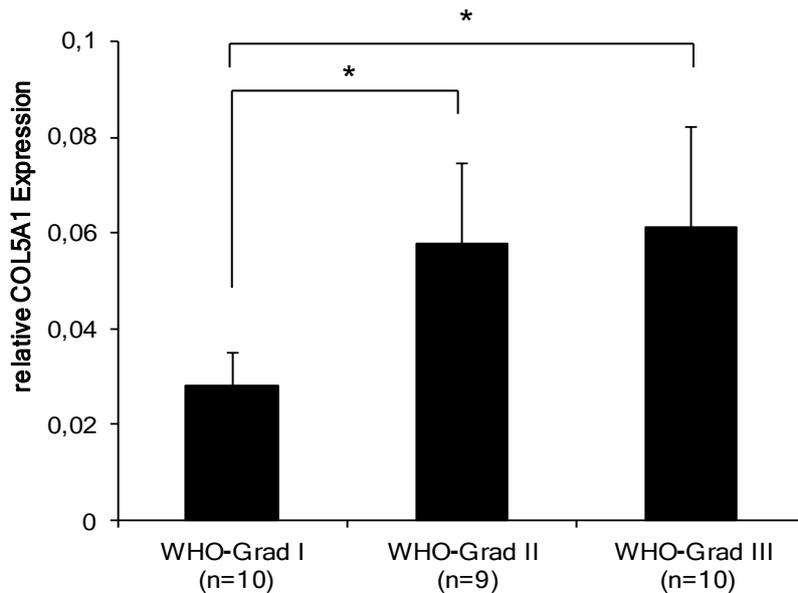


Abbildung 22: *COL5A1* Expression in Meningeomen.

Trotz des augenscheinlich wichtigen Einflusses des Tumorgrades wurde als nächstes geprüft, ob eine direkte Korrelation zwischen *miR-145* und *COL5A1*-mRNA über alle Meningeome der Serie hinweg bestand. Aufgrund der zu geringen Gruppengrößen war eine Korrelationsanalyse pro Tumorgrad nicht möglich. Jedoch wurde ein Streudiagramm zum Betrachten aller Tumoren mit den Werten der relativen *miR-145* und *COL5A1* Expression erstellt, um einen möglichen Zusammenhang zu visualisieren (siehe Abbildung 23). Des Weiteren wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet. Es handelte sich jeweils, um die gleiche RNA-Serie von humanen Meningeomen, welche schon in Abbildung 3 und Abbildung 22 dargestellt sind. Das entstandene Streudiagramm lässt sich in zwei Bereiche einteilen. Der erste Bereich liegt unterhalb der angegebenen Schwelle und beinhaltet Meningeome ($n = 17, 59\%$) mit geringer *COL5A1*-mRNA ohne Rücksicht auf ihren *miR-145* Gehalt. Wohingegen der zweite Bereich oberhalb der Schwelle liegt und Meningeome ($n = 12, 41\%$) mit mittlerem und hohem *COL5A1* Level präsentiert, welche mit *miR-145* negativ korreliert sind. Wenn alle Proben, die auf bzw. oberhalb der angegebenen Schwelle liegen, dem zweiten Bereich zugeordnet werden, beträgt der r-Wert $-0,56$ ($p = 0,055$). Wenn die Probe, die mit einem Pfeil markiert ist, aus der Berechnung herausgelassen wird, wird die Korrelation signifikant ($r = -0,601$; $p = 0,050$). Der Bereich beinhaltet eine ähnliche Anzahl von Tumor-Proben der jeweiligen Malignitätsgrade [WHO-Grad I mit $n = 3$, WHO-Grad II mit $n = 4$ und WHO-Grad III

mit $n = 4 (+ 1)$], woraus sich schließen lässt, dass *miR-145* nicht der einzige Faktor der *COL5A1* Regulation ist.

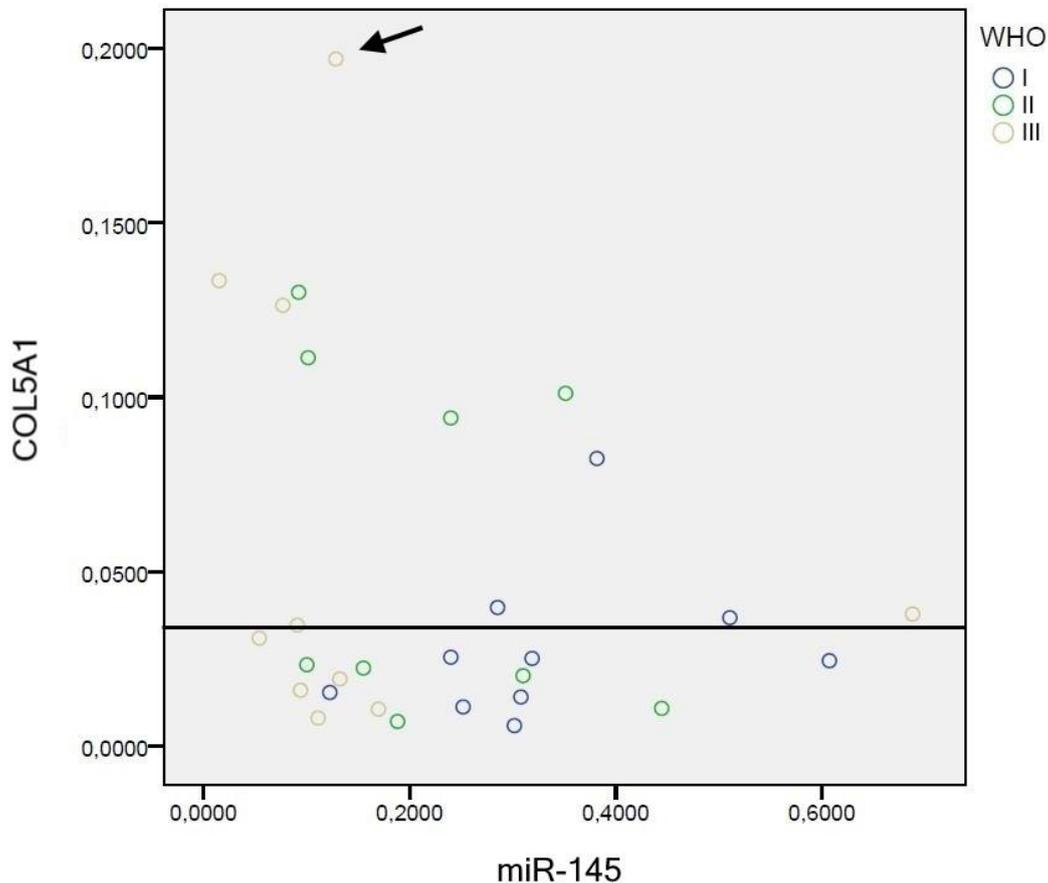


Abbildung 23: Streudiagramm und Pearson-Korrelationskoeffizient zwischen der relativen *miR-145* und *COL5A1* Expression (gleiche Serie humaner Meningeome).

Es wurde ein Gewebe-Mikroarray immunhistochemisch mit einem Antikörper auf das von *COL5A1* kodierte Kollagen Typ 5 angefärbt (siehe Abbildung 24). Dieser Gewebe-Mikroarray bestand aus 53 Meningeomen, davon 30 mit WHO-Grad I, 14 atypische WHO-Grad II und 9 anaplastische WHO-Grad III. Die immunohistochemische Analyse zeigte eine Expression von *COL5A1* in allen Tumoren mit einer steigenden Tendenz der Immunreaktivität in höhergradigen Meningeomen, wohingegen die Immunfärbung in normalem meningealem Gewebe ausblieb (vgl. Abbildung 24d, der mit Sternchen markierte Bereich).

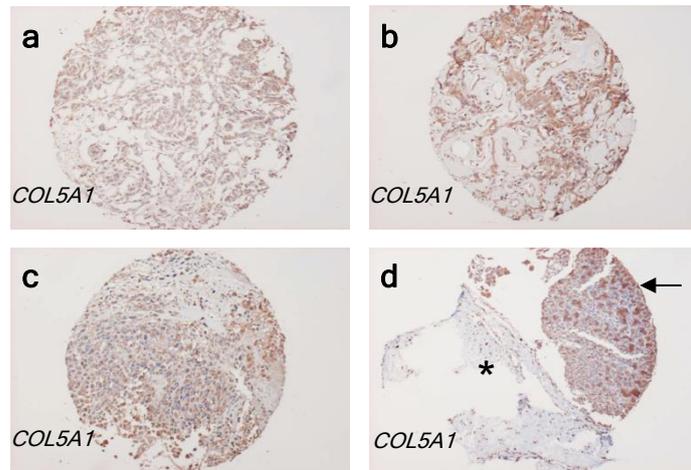


Abbildung 24: Darstellung der immunhistochemischen Färbung eines Gewebe-Mikroarrays mit *COL5A1*.

a, b - benigne Meningeome WHO-Grad I (**a** - meningotheliale Unterart, **b** - angiomatöse Unterart); **c, d** - aggressive Meningeome (**c** - anaplastisches Meningeom WHO-Grad III, **d** - atypisches Meningeom WHO-Grad II).

Im Anschluss wurde auf Proteinebene untersucht, ob COL5A1 in Meningeomen unterschiedlicher Malignitätsgrade sowie in besonders infiltrativen Gliomzellen und anderen Tumorzellen (Mammakarzinom und Melanom) vorkommt (siehe Abbildung 25). Offenbar kommt Kollagen Typ 5 ubiquitär aber in wechselnden Mengen in diversen humanen Tumorzelllinien aus unterschiedlichsten Geweben vor. Es gibt jedoch keine klare Trennung in der Art, dass Zellen aus bekanntermaßen hochinfiltrativen Tumoren (Glioblastome) besonders hohe Proteinlevel aufwiesen oder grundsätzlich hochgradige Meningeome mehr als solche des WHO-Grades I. Das zeigt wiederum, dass Kollagen Typ 5 nur ein Faktor von vielen ist, der die Tumorzellmigration beeinflusst.

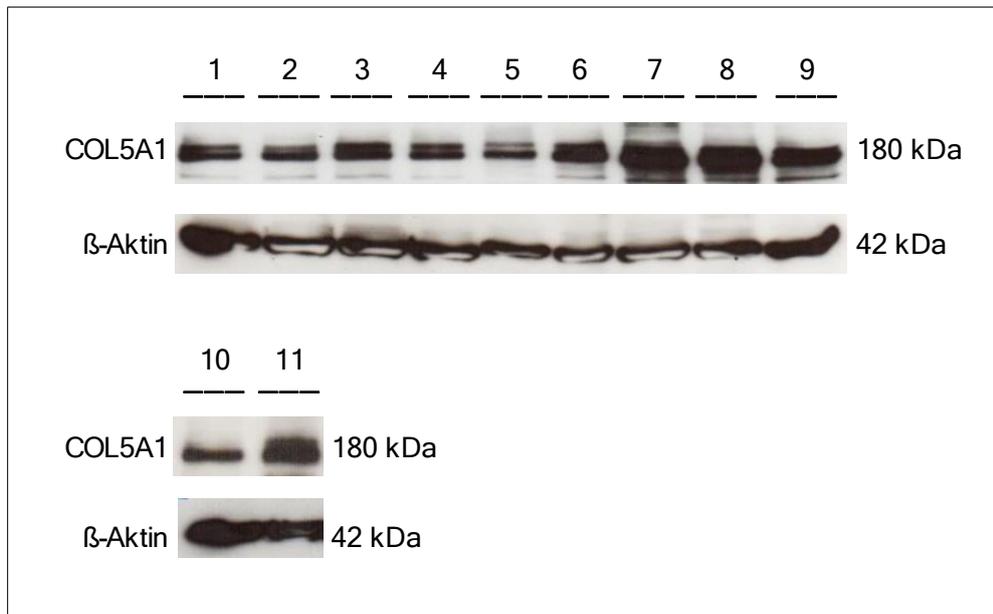


Abbildung 25: COL5A1 im Spektrum von unterschiedlichen Zelllinien.

1 bis 4 künstlich immortalisierte Zellen aus einem Meningeom WHO-Grad I (**1** SF4068 SCN, **2** SF4068 SDN, **3** SF4068 SCC, **4** SF4068 SDC); **5 bis 7** Zellen aus humanen Glioblastomen (**5** U-87 MG, **6** U-118 MG, **7** U-138 MG); **8** MCF-7 (Mammakarzinom); **9, 10** Zellen aus humanen Meningeomen WHO-Grad III (**9** IOMM-Lee, **10** KT21-MG1); **11** MM-AN (metastasierendes Melanom).

Das nächste Ziel war, einen stabilen, lentiviralen Knockdown von *COL5A1* in IOMM-Lee Zellen zu generieren, um zu prüfen, ob sich einige der *in vitro* bzw. *in vivo*, nach der erzwungenen Expression von *miR-145*, gefundenen Effekte ebenfalls durch diesen Knockdown erreichen lassen. Das wäre zumindest für die Motilitäts-assoziierten Effekte zu erwarten gewesen, falls *COL5A1* wirklich ein negatives Target von *miR-145* wäre. Zwar gelang die Transfektion von IOMM-Lee mit lentiviralen *COL5A1*-shRNA-Vektoren recht gut (siehe Abbildung 26), aber die beobachtete negative Regulation des Kollagen Typ 5 schien nicht spezifisch mit den shRNA-Sequenzen assoziiert zu sein, da der Knockdown ebenfalls mit der irrelevanten Kontrollsequenz (shK) recht effektiv war (siehe Abbildung 27). Es handelte sich möglicherweise nur um unspezifische toxische Effekte der Vektoren. Während diese Vektoren neben GFP keinen selektierbaren Marker enthielten, zeigte sich ferner die Verwendung alternativer Vektoren mit Puromycin-Resistenz als aussichtslos, da sich die Zelllinie IOMM-Lee als hochgradig endogen Puromycin-resistent erwies. Andere Meningeom-Zelllinien wurden für dieses aufwendige Verfahren nicht mehr ins Auge gefasst, da nach eigener Erfahrung unter allen verfügbaren Linien lediglich IOMM-Lee ausreichend schnell als Xenograft gut messbare Tumoren bildete.

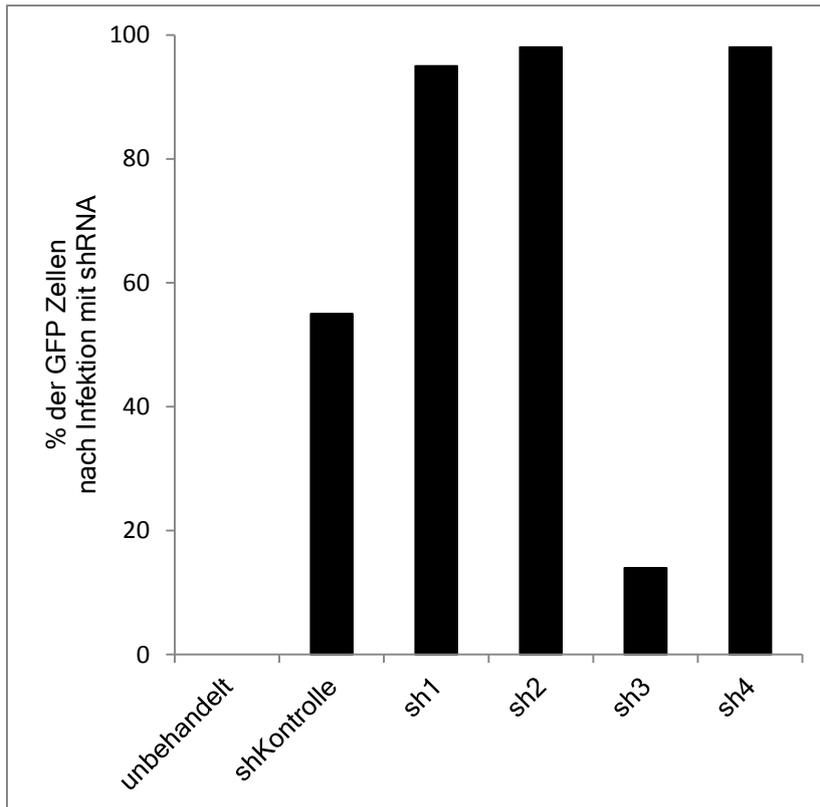


Abbildung 26: Technische Kontrolle stabiler *COL5A1*-sh-Transfektion.

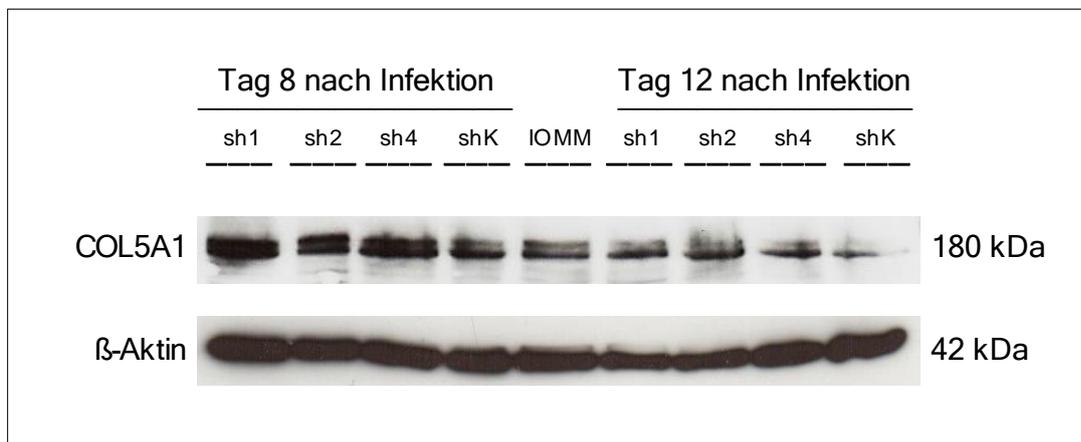


Abbildung 27: Effektivität der sh-Transfektion per Western Blot am Tag 8 und am Tag 12 nach der Infektion. Aufgrund mangelnder Transfektionseffizienz war sh3 nicht im Western Blot analysiert worden.

Da es außerdem für das Aktinfilamente bündelnde Protein Fascin (*FSCN1*) in der Literatur eine Assoziation zu Tumorzell-Motilität/ -Malignität und *miR-145* gab (Fuse et al. 2011; Feng et al. 2014), wurde eine mögliche Rolle von *FSCN1* in diesem Zusammenhang untersucht (unter den 84 Genen des PCR Arrays war Fascin nicht vertreten). Während sich auf mRNA-Ebene ein inverser Zusammenhang zwischen *miR-145* und *FSCN1* an den syngenen Zellpaaren andeutete (*, $p = 0,05$, siehe Abbildung 28), war auf Proteinebene keine Differenz zwischen den beiden Zelltypen zu erkennen (siehe Abbildung 29). Möglicherweise ist der Effekt von *miR-145* auf *FSCN1* zu gering und im Western Blot nicht mehr erkennbar. Die Verteilung von *FSCN1*-mRNA in der humanen Meningeomserie entsprach zudem nicht eindeutig einem inversen Verhalten zu *miR-145* (vgl. Abbildung 30), wie dies bei *COL5A1* der Fall gewesen war. Fascin erscheint somit als weniger aussichtsreicher Kandidat für eine Vermittlung der motilitätshemmenden Wirkung der *miR-145* und wurde nicht weiter untersucht.

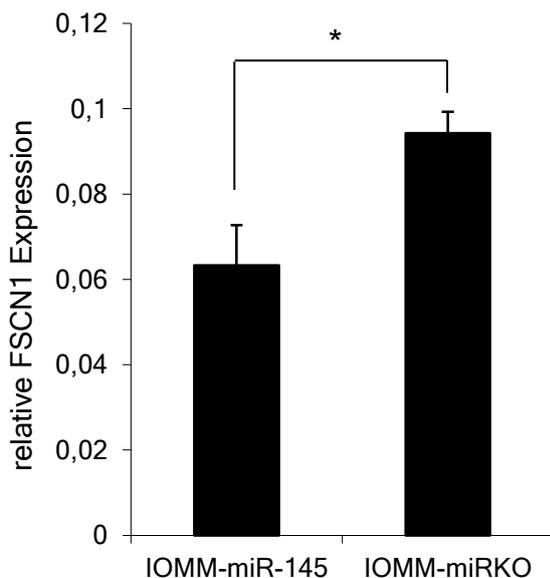


Abbildung 28: *FSCN1*-mRNA nach stabiler *miR-145*-Transduktion.

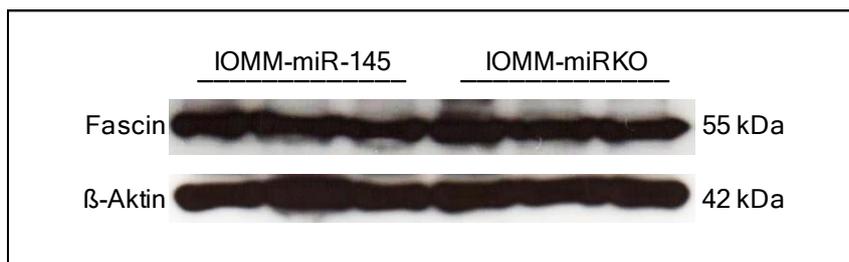


Abbildung 29: *FSCN1*-Protein nach stabiler *miR-145*-Transduktion.

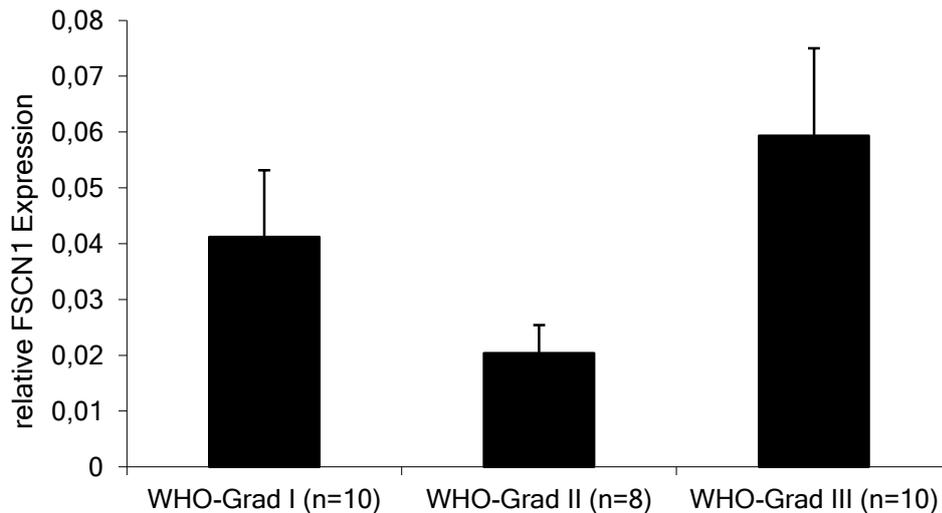


Abbildung 30: *FSCN1*-mRNA in Meningeomen.

4.6 Therapieversuche *in vivo* mit Angriffspunkt an der Tumorzellmigration

Bisher war in der vorliegenden Dissertation nachgewiesen worden, dass *miR-145* beim Meningeom *in vivo* eine zumindest moderate Tumorsuppressorfunktion hat, d.h. das Tumorwachstum signifikant verlangsamt. Gleichzeitig war, vor allem durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe *in vitro*, bereits bekannt, dass dieselbe miRNA ebenso hemmend in die Tumorzellmotilität eingreift. Während der hier vorgelegten Dissertation ergaben sich aus der Literatur zu anderen Tumorentitäten (Sachdeva and Mo 2010; Chiyomaru et al. 2010; Götte et al. 2010; Zhang et al. 2011) ebenfalls Hinweise auf eine motilitäts- bzw. invasionshemmende Eigenschaft dieser miRNA. Diese anti-migratorische Funktion könnte möglicherweise mit einer Rolle spielen für den hier beobachteten Benefit der *miR-145* im orthotopen Mausmodell. Die genutzte Zelllinie IOMM-Lee zeigt nämlich im Maushirn eine zapfenförmige Invasion, wengleich die Quantifizierung eines denkbaren Einflusses von *miR-145* technisch kaum möglich war. Ebenfalls können humane Meningeome, besonders solche höheren WHO-Grades, invasiv wachsen. Invasionsvorgänge könnten gleichermaßen prognostisch relevant sein.

Aus diesen Gründen sollte versucht werden, mithilfe des in der vorliegenden Arbeit erstellten orthotopen Xenograft-Modells zu prüfen, inwieweit eine primär an der Tumorzellmigration ansetzende Therapie erfolgversprechend sein könnte. Als Xenograft wurden dabei maligne IOMM-Lee Zellen ohne genetische Manipulation

verwendet. Als Therapeutikum wurde das Pentapeptid Cilengitide genutzt, weil es ein klassischer Migrationshemmer mit ersten klinischen Studien bei anderen Entitäten war und kaum Nebenwirkungen erwartet wurden.

Zu Beginn musste verifiziert werden, dass die notwendigen Zielstrukturen des Peptids Cilengitide in den Tumoren vorhanden waren. Es konnte schon zuvor in immunhistochemischen Untersuchungen gezeigt werden, dass die Integrine $\alpha\beta3$ und $\alpha\beta5$ in Meningeomen exprimiert wurden (Bello et al. 2000). Diese beiden Integrine sind zwei Targets des Integrin-Antagonisten Cilengitide (Mas-Moruno et al. 2010). Die Expression von $\alpha\beta3$ und $\alpha\beta5$ konnte mithilfe eines Gewebe-Mikroarray bestätigt werden. Der Gewebe-Mikroarray bestand aus 46 Meningeomen unterschiedlicher Malignität (davon 29 WHO-Grad I, 11 atypische WHO-Grad II und 6 anaplastische WHO-Grad III Tumoren). Dabei wurde herausgefunden, dass das Integrin $\alpha\beta5$ in den meisten Tumoren stark exprimiert wurde (siehe Abbildung 31a, b, c), wohingegen sich das Integrin $\alpha\beta3$ lediglich in den Blutgefäßen des Tumors detektieren ließ (die Tumorzellen wurden nicht mit dem Antikörper gegen das Integrin $\alpha\beta3$ angefärbt, siehe Abbildung 31d). Des Weiteren wurde zudem in normalem leptomeningealem Gewebe (siehe Pfeile in Abbildung 31a) und in interstitiellem Gewebe (siehe Pfeile in Abbildung 31c) eine Expression des Integrins $\alpha\beta5$ gefunden. In der Abbildung 31 stellt jeder Balken 200 μm dar. Die Intensität der immunhistochemischen Färbung mit dem Integrin $\alpha\beta5$ (semiquantitative Abstufung mit folgenden Bewertungen: - keine Färbung, + schwache Färbung, ++ mäßige Färbung, +++ starke Färbung) und deren Verteilung (in Prozent) innerhalb der jeweiligen Tumorggrade sind in Tabelle 24 zusammengefasst. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Malignitätsgraden.

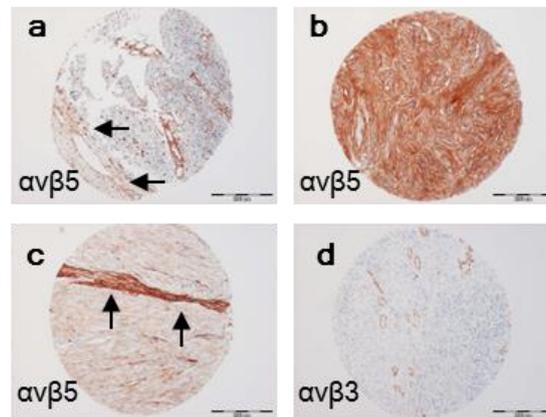


Abbildung 31: Darstellung der immunhistochemischen Färbung eines Gewebe-Mikroarrays mit Integrin $\alpha v\beta 5$ (a, b, c) und $\alpha v\beta 3$ (d).
a - atypisches Meningeom WHO-Grad II; **b,c** - fibroblastisches Meningeom WHO-Grad I; **d** - meningotheliales Meningeom WHO-Grad I.

Tabelle 24: Immunhistochemische Färbung von humanen Meningeomen unterschiedlicher Malignität mit $\alpha v\beta 5$

| | $\alpha v\beta 5$ | n (%) |
|--------------------|-------------------|---------|
| WHO-Grad I (n=29) | - | 3 (10) |
| | + | 9 (31) |
| | ++ | 5 (17) |
| | +++ | 12 (41) |
| WHO-Grad II (n=11) | - | 1 (9) |
| | + | 2 (18) |
| | ++ | 2 (18) |
| | +++ | 4 (55) |
| WHO-Grad III (n=6) | - | 1 (17) |
| | + | 0 (0) |
| | ++ | 1 (17) |
| | +++ | 4 (67) |

Parallel dazu waren in der Arbeitsgruppe auch per Real-Time-PCR die entsprechenden Integrin-Untereinheiten nachgewiesen worden (Daten nicht gezeigt) (Wilisch-Neumann et al. 2013). Ebenfalls war die Existenz dieser Integrine auf

isolierten Meningeomzellen (Zelllinien) durch Immunfluoreszenz (FACS) dargestellt worden (Daten nicht gezeigt).

Die Kinetik der Tumorentwicklung im subkutanen (Dosierung 8 mg/kg Cilengitide) und orthotopen Xenograft-Modell wurde durch Cilengitide allein nicht signifikant beeinflusst (Daten des subkutanen Modells nicht gezeigt). Dies galt beim orthotopen Xenograft-Modell nicht nur für eine niedrige Dosierung von 8 mg/kg Cilengitide (siehe Abbildung 32), sondern selbst noch bei der in Mäusen höchstmöglichen Dosierung von 75 mg/kg Cilengitide (siehe Abbildung 33).

Da höhergradige und zudem inkomplett resezierte Meningeome in der Regel einer Bestrahlung unterzogen werden, sollte ein möglicher Effekt von Cilengitide ebenfalls auf dem Hintergrund einer Radiatio geprüft werden. Dies geschah nur noch mit der höchstmöglichen Dosierung des Pentapeptids und ausschließlich am orthotopen Modell. Abbildung 33 zeigt daher vergleichend alle Daten dazu in der Zusammenfassung.

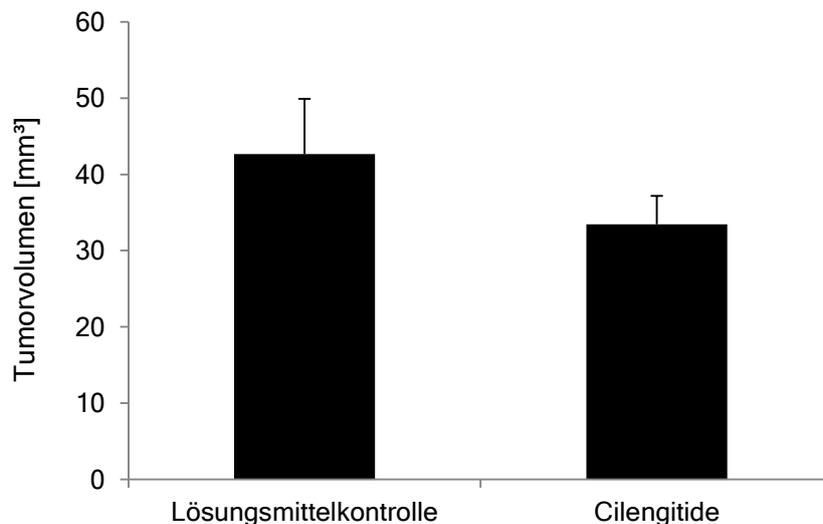


Abbildung 32: Schätzung des Tumorzvolumens des orthotopen Mausmodells mit IOMM-Lee Zellen. Ohne Bestrahlung: 7 Kontrolltiere vs. 7 Tiere mit 8 mg/kg Cilengitide Behandlung. MRT Tag 10.

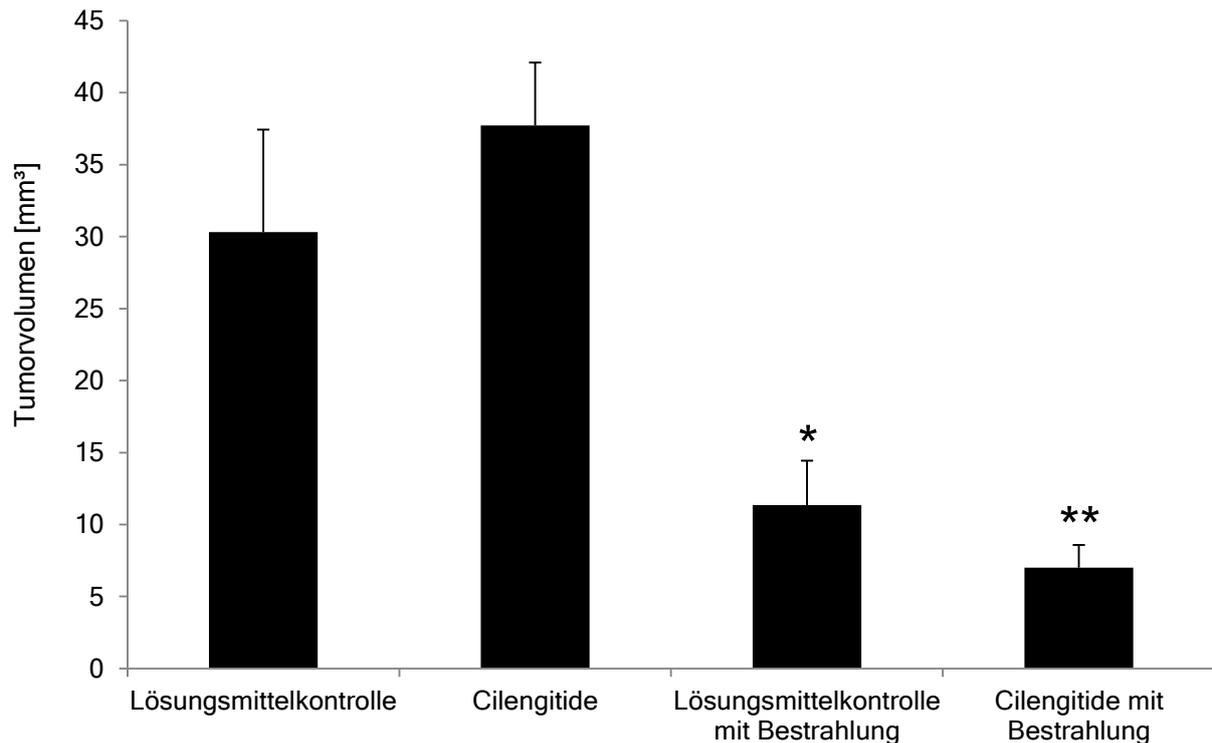


Abbildung 33: Schätzung des Tumorzusammenfassung des orthotopen Mausmodells mit IOMM-Lee Zellen. Ohne Bestrahlung: 6 Kontrolltiere vs. 7 Tiere mit 75 mg/kg Cilengitide Behandlung. Mit Bestrahlung: 6 Kontrolltiere vs. 6 Tiere mit 75 mg/kg Cilengitide Behandlung. MRT Tag 10. Die gekennzeichneten Signifikanz bezieht sich auf die Kontrolle.

Die Bestrahlung (*, $p \leq 0,05$) und die Kombinationsbehandlung von Radiatio mit Cilengitide (**, $p \leq 0,01$) wirkten signifikant gegenüber der Lösungsmittelkontrolle. Da die Doppeltherapie zu einer weiteren Halbierung des Tumorzusammenfassung laut MRT führte, ist ein zusätzlicher Vorteil der Substanz gegenüber einer alleinigen Bestrahlung denkbar, konnte allerdings nicht statistisch streng nachgewiesen werden. Der Unterschied von Radiatio und Kombinationsbehandlung von Radiatio mit Cilengitide spiegelt sich dabei nicht in den Überlebenszeiten wider (siehe Abbildung 34), sodass die Wirkung von Cilengitide skeptisch zu beurteilen blieb. Der Log-Rang-Test ergab, dass die beiden Gruppen mit Bestrahlung höchst signifikant länger leben, als die beiden Gruppen ohne Bestrahlung (***, $p \leq 0,001$). Die beiden jeweils stark überlappenden Treppenkurven sind erwartungsgemäß nicht signifikant verschieden (siehe Abbildung 35).

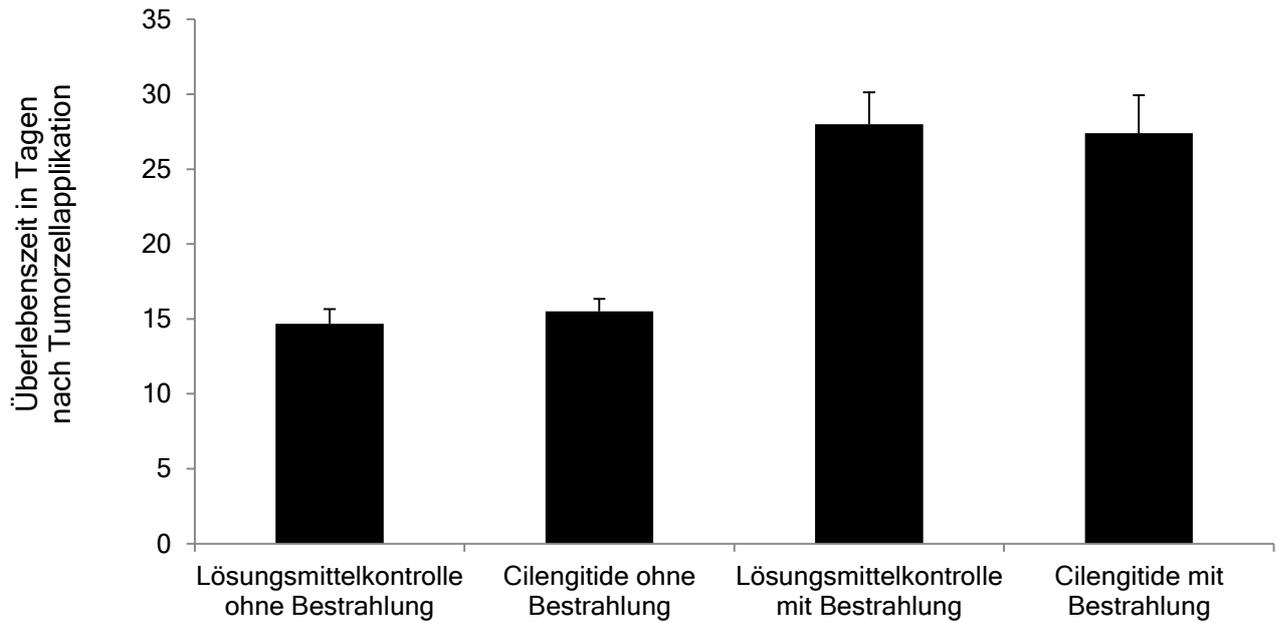


Abbildung 34: Überlebenszeitversuch.

Ohne Bestrahlung: 6 Kontrolltiere vs. 6 Tiere mit 75 mg/kg Cilengitide Behandlung.
 Mit Bestrahlung: 4 Kontrolltiere vs. 5 Tiere mit 75 mg/kg Cilengitide Behandlung.

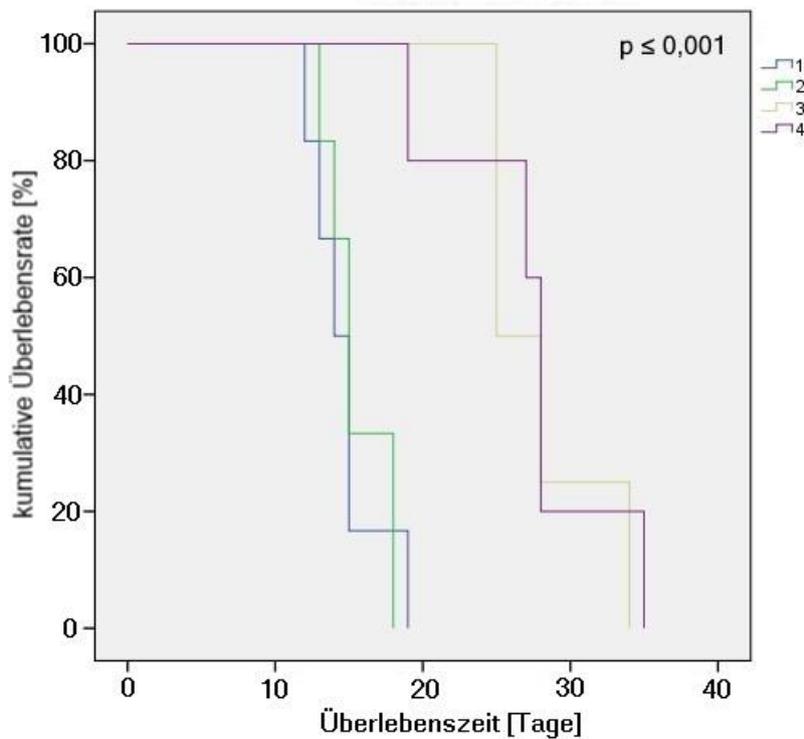


Abbildung 35: Kaplan-Meier-Methode zur Überlebenszeitanalyse.

1 - Lösungsmittelkontrolle ohne Bestrahlung; 2 - Cilengitide ohne Bestrahlung;
 3 - Lösungsmittelkontrolle mit Bestrahlung; 4 - Cilengitide mit Bestrahlung.

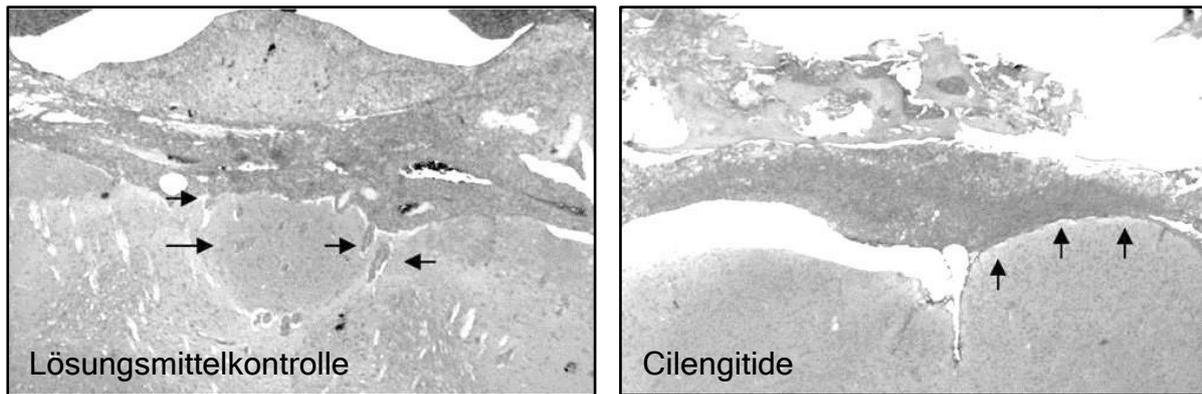


Abbildung 36: Histologische Analyse der Tiere für den Überlebenszeitversuch.

Zungenartige Infiltrationen, welche typisch für humane Meningeome sind, wurden in allen sechs Kontrolltieren gefunden (Pfeile in der Abbildung 36 bei Kontrolle; vgl. Tabelle 25). Wohingegen die Invasion bei den mit Cilengitide behandelten Tieren zum größten Teil fehlte (Pfeile in der Abbildung 36 bei Cilengitide kennzeichnen die Grenze zwischen dem Tumor und Gehirn). Lediglich bei zwei von sechs Tieren zeigte sich eine Invasion (vgl. Tabelle 25). Die Invasionskriterien wurden ohne den zusätzlichen Effekt der Bestrahlung betrachtet. Die Bestrahlung wäre in diesem Fall kontraproduktiv, da das Massenwachstum des Tumors durch die Bestrahlung gehemmt werden würde.

Tabelle 25: Vergleich des Invasionsgrads der Kontrolltiere und der mit Cilengitide behandelten Tiere für den Überlebenszeitversuch ohne zusätzliche Bestrahlung

| | Invasion der Meningeomzellen vorhanden | Invasion der Meningeomzellen fehlt |
|--------------------------------------|--|------------------------------------|
| Kontrolltiere (n = 6) | 6 | 0 |
| Cilengitide behandelte Tiere (n = 6) | 2 | 4 |

Das IOMM-Lee-Xenograft-Modell mit seinem recht schnellen Massenwachstum hat sich in der Arbeitsgruppe gut bewährt zur Darstellung von Effekten primär proliferationshemmender Substanzen (Pachow et al. 2013b). Es bestand aber immer der Verdacht, dass es nur begrenzt tauglich sein könnte zur Messung von Effekten primär an der Migration ansetzender Substanzen. Aus diesem Grund wurde das Experiment zur Cilengitide-Monotherapie mit der höchstmöglichen Dosis (75 mg/kg Cilengitide) mit malignen KT21-MG1 Zellen wiederholt, die deutlich langsamer und

stärker infiltrativ wachsende Tumoren bilden. Hier könnte ein Effekt der Cilengitide-Monotherapie vermutet werden (siehe Abbildung 37). Dieser wurde jedoch nicht signifikant, da die Streuung der im MRT schätzbaren Tumorumfänge hier bedeutend größer war. Zum einen kann es daran liegen, dass selbst nach drei Wochen bei den Xenografts noch sehr kleine Tumorumfänge auftraten und zum anderen an der problematischeren MRT-Quantifizierung, aufgrund der höheren Infiltration, wie histologisch sichtbar war (nicht gezeigt).

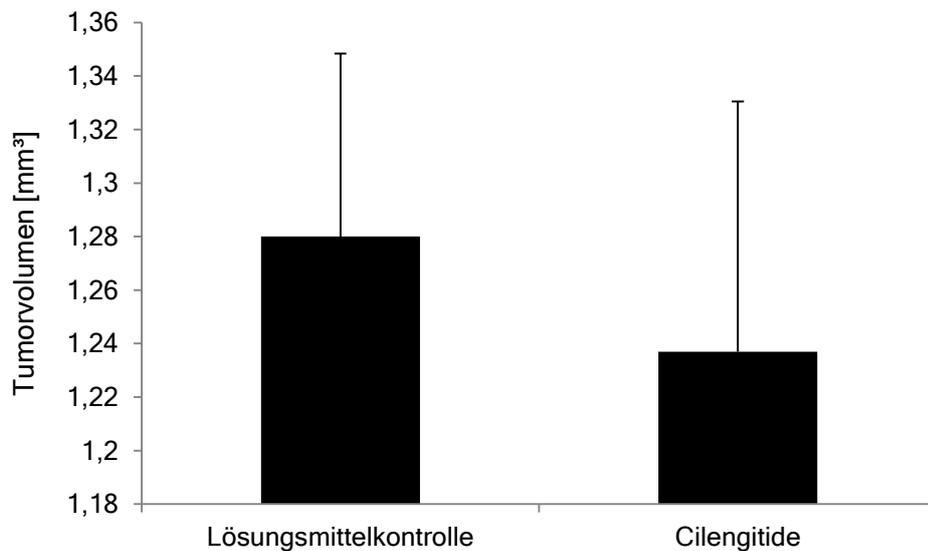


Abbildung 37: Tumorumfang des orthotopen Mausmodells mit KT21-MG1 Zellen.
5 Kontrolltiere vs. 5 Tiere mit 75 mg/kg Cilengitide Behandlung. MRT Tag 21.

5 Diskussion

5.1 Die micro-RNA-145

5.1.1 Tumorsuppressorfunktion der *miR-145*

Nachdem 1993 die erste miRNA (*lin-4*) und im Jahr 2000 die zweite miRNA (*let-7*) entdeckt wurden, welche beide die Entwicklung des Nematoden *C. elegans* steuern, wurden bis heute tausende weitere miRNAs im Menschen und anderen Spezies identifiziert (Wiemer 2007; Almeida et al. 2011; Orellana and Kasinski 2015). Seit etwa 2002 wird eine Rolle der miRNA bei Krebserkrankungen näher diskutiert. Des Weiteren sind in den letzten zehn Jahren hunderte Artikel zum Thema miRNA bei Tumorerkrankungen erschienen (Eiring et al. 2010), wobei die miRNA-Gene teilweise als das Tumorwachstum fördernde Onkogene und teilweise als Tumor-Suppressorgene agieren. Verschiedene miRNAs spielen eine Rolle bei Migrationsvorgängen von Tumorzellen und bei der Metastasierung (Almeida et al. 2011; Orellana and Kasinski 2015). Die erste Arbeit in Bezug auf die Funktion der miRNAs im Zusammenhang mit der Aktivierung der Metastasierung wurde im Jahr 2007 veröffentlicht (Ma et al. 2007). Verschiedene miRNAs stellen prognostische Faktoren bei Karzinomen dar (Almeida et al. 2011). Als Beispiel ist hier *let-7* zu erwähnen; 2004 wurde *let-7* als prognostischer Faktor in Bezug auf Lungenkrebs publiziert (Takamizawa et al. 2004; Orellana and Kasinski 2015). Für die in der vorliegenden Arbeit beim Meningeom betrachtete *miR-145* gibt es inzwischen bei unterschiedlichen Tumorentitäten Hinweise auf eine Tumorsuppressor-Funktion durch den beobachteten Verlust der miRNA in den Tumoren. Beim nicht kleinzelligen Lungenkarzinom zeigte z.B. eine 2017 erschienene Studie den relativen Verlust dieser miRNA gegenüber angrenzendem Nicht-Tumorgewebe an 50 Fällen (Li and Zheng 2017). Es gibt bereits Ansätze zur Nutzung von miRNA als therapeutische Zielstruktur. Je nach Funktion der jeweiligen miRNA-Spezies bei einer Tumorerkrankung (Onkogene oder Suppressor-Funktion) werden dabei zwei Strategien verfolgt, Hemmung oder aber umgekehrt Substitution der Funktion (Orellana and Kasinski 2015).

In einem ersten Versuch im Jahr 2009, miRNAs mit einem Meningeom-Bezug zu finden, wurden 43 miRNAs identifiziert, die in benignen Meningeomen im Vergleich zu meningealem Gewebe hoch- oder herunterreguliert sind (Saydam et al. 2009). Diese Studie beinhaltete keine höhergradigen Tumoren und hat *miR-145* nicht untersucht. Es wurde jedoch herausgefunden, dass miR-200a subkutanes Wachstum xenotransplantiert humaner Meningeomzellen in Nacktmäusen inhibiert. Diesem Molekül konnte somit erstmals eine mutmaßliche Suppressorfunktion beim Meningeom zugeschrieben werden. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde beschrieben, dass miR-200a im Leberzellkarzinom (Hepatozelluläres Karzinom - HCC) herunterreguliert vorliegt. Eine Überexpression von miR-200a führte zur Unterdrückung der HCC-Metastasierungsfähigkeit, einschließlich der HCC-Zellmigration, Invasion und Metastasierung, *in vitro* und *in vivo* (Wang et al. 2017). Aktuell ist die Zahl als relevant eingeordneter miRNA-Alterationen im Meningeom noch gering (Galani et al. 2017).

In der vorliegenden Arbeit wurde an einem orthotopen, d.h. besonders realitätsnahen Xenograft-Modell der Maus nachgewiesen, dass die Rekonstitution der in diesen aggressiven Meningeomzellen verloren gegangenen Expression von *miR-145* zu einem signifikant gehemmten Tumorwachstum führt. Damit wurde ebenso *in vivo* der Tumorsuppressor-Charakter nachgewiesen. Zudem wurde *miR-145* als die erste miRNA aufgezeigt, deren Verlust mit höhergradigen Meningeomen assoziiert wird und ein Kandidatengen für hirninvasives Meningeomwachstum darstellt. Diese miRNA-Spezies ist nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht nur grundsätzlich in Meningeomen herunterreguliert, sondern vor allem in den atypischen und malignen Tumoren der WHO-Grade II und III signifikant stärker vermindert als in den benignen Tumoren des WHO-Grades I. Dieser Befund gehört zu den wenigen und konsistentesten molekularen Unterschieden zwischen benignen und biologisch aggressiven Subtypen, wenn man bedenkt, dass der für Meningeome klassische Verlust des Tumorsuppressors *NF2* alle Subtypen betrifft. Erst in jüngster Zeit zeigten sich aktivierende Mutationen im Promoter des Gens *TERT* als möglicherweise auf aggressive Subtypen beschränkte molekulare Veränderung (Goutagny et al. 2014). Die lokale Hirninvasion spielt bei höhergradigen Meningeomen eine wesentliche Rolle und selbst eine Metastasierung in andere Organe kommt bei diesen Subgruppen vor. Für beide Vorgänge ist u.a. die Motilität der Tumorzellen

entscheidend. Daher kommt der Identifizierung von Genen eine wichtige Bedeutung zu, die durch *miR-145* reguliert sind und eine Rolle bei der Zelladhäsion spielen, der Wechselwirkung zwischen Meningeomzelle und extrazellulärer Matrix sowie deren Motilität. Im Gen *COL5A1* wurde ein potentiell Kandidaten-Gen in der vorliegenden Arbeit gefunden (siehe Abschnitt 4.5).

Es zeigte sich schon bei anderen Tumorentitäten, dass die Regulation der Invasion durch *miR-145* beeinflusst wird. Im Bereich intrakranieller Tumoren des Erwachsenenalters zeigen Gliome die mit Abstand höchste und von Anfang an bestehende Neigung zur lokalen Hirninvasion an. Dies ist ein Anzeichen für eine extrem ausgeprägte Motilität. Sie spielt eine fatale Rolle, weil die chirurgische Resektion konterkarierend vor allem beim Glioblastom, dem aggressivsten hirneigenen Tumor des Menschen, ist. Die Erforschung von Motilitätsfaktoren als potenzieller therapeutischer Ansatzpunkt ist beim Glioblastom von hoher Bedeutung und wird bei dieser Tumorentität seit Jahren intensiv verfolgt, bis hin zu klinischen Studien zur pharmakologischen Inhibition für die Migration relevanter Membranproteine (Wilisch-Neumann et al. 2013). Erstaunlich war daher der Befund, dass in Glioblastomen die Überexpression von *miR-145* und nicht ihr Verlust einer invasiveren Tumorphosphorepopulation zugeschrieben wird (Koo et al. 2012). Solche Widersprüche können wahrscheinlich durch die vielfältigen Wirkungen einer einzelnen miRNA erklärt werden, d.h. durch die oft große Zahl von ihr regulierter Gene, deren Expression und Bedeutung von der Tumorentität abhängt.

Passend zu den Befunden der vorliegenden Arbeit sind diejenigen bei Magenkrebs, hier inhibiert eine Überexpression an *miR-145* die Invasion und Metastasierung durch Regulation von N-Cadherin und MMP-9 (Gao et al. 2013). Hierin kommen schon die multiplen Zielstrukturen zur Geltung, da u.a. eine Protease (MMP-9) betroffen ist, die die Auflösung der extrazellulären Matrix unterstützt. Generell könnten außerdem beim Meningeom ganz unterschiedliche Zielproteine die Wirkung der *miR-145* auf die Hirninvasion einerseits und auf die Metastasierung andererseits vermitteln, da für letztere z.B. die Durchdringungsfähigkeit der Basalmembran von Gefäßendothelien eine Rolle spielt, wie dies ebenfalls für Karzinome zutrifft. In einem aktuelleren Paper wird zudem beschrieben, dass *miR-145* möglicherweise bei anderen Tumorentitäten indirekt die Migration und Invasion von Tumorzellen durch Einwirkung auf die Epithelial-mesenchymale Transition beeinflusst (Sathyanarayanan et al. 2016).

Einen hirninvasiven Phänotyp zeigten im orthotopen Tiermodell der vorliegenden Arbeit die malignen Meningeom-Xenotransplantate eindeutig (zapfenförmige Invasion). Da deren Quantifizierung am Tiermodell schwierig ist, wurden zudem Ansätze unternommen, die Rolle von *miR-145* bei der Invasion an organotypischen hippokampalen Schnittkulturen (OHC) näher zu beleuchten. Dazu wurden OHCs mit malignen Meningeomzellen mit und ohne rekonstituierter Expression von *miR-145* verglichen. Wegen der in kurzen Beobachtungszeiträumen doch geringen Invasion auf OHCs applizierter, fluoreszierender Tumorzellen in die Tiefe und wegen der sehr beschränkten zeitlichen Haltbarkeit dieser Co-Kulturen, konnten keine eindeutigen Aussagen zur Invasion erzielt werden. Immerhin zeigten jedoch die IOMM-miR-145 Zellen gegenüber den IOMM-miRKO Zellen längere zytoplasmatische Fortsätze. Dies kann möglicherweise so gedeutet werden, dass die rekonstituierte *miR-145*-Expression einen differenzierteren Phänotyp der Meningiomzellen mit vermindertem Wanderungspotential begünstigt. Allerdings ist ohne weitere *in vitro* Analysen, wie etwa zur Adhäsion und Migration auf Protein-beschichteten Oberflächen, keine zuverlässige Aussage möglich. Bei Karzinomzellen wird ebenfalls aktuell über eine Rolle von *miR-145* bei Migration und Invasion diskutiert (Jiang et al. 2016; Li et al. 2016).

Für die *in vivo* Mikroskopie fluoreszenzmarkierter Tumorzellen konnte in der vorliegenden Arbeit nur der prinzipielle Machbarkeitsnachweis erbracht werden. Bei gründlicher Ausarbeitung dieser aufwendigen Techniken, unter Einschluss geeigneter Gegenfärbung relevanter Strukturen, lassen sich z.B. für die Ausbreitung von Gliomzellen im Hirngewebe interessante Befunde gewinnen (Winkler et al. 2009). Speziell mit der Technik der 2-Photonen-Mikroskopie wurde die Verteilung von Melanom-Zellen in Hühnerembryonen *in vivo* und im Zeitverlauf analysiert (Bailey and Kulesa 2014). Die Technik wurde des Weiteren z.B. angewandt, um festzustellen, wann erste fluoreszenzmarkierte Karzinomzellen der Zunge von Mäusen in den Lymphknoten erscheinen und dass diese nicht immer zu manifesten Metastasen auswachsen (Szaniszlo et al. 2014). Die Publikation von Burrell und Kollegen (Burrell et al. 2013) zeigt eindrucksvoll die technischen Möglichkeiten dieser Technik, belegt aber ebenfalls Aufwand und Fallstricke.

5.1.2 *MiR-145 als potenzieller Prognosefaktor beim Meningeom*

In dieser Arbeit zeigte sich eine reduzierte Expression von *miR-145* bei Meningeomen der WHO-Grade II und III im Vergleich zu benignen Subtypen. Dies legt zumindest nahe, dass der Verlust dieses Tumorsuppressors ein prognostischer Marker sein könnte für die mediane Dauer des Überlebens oder des progressionsfreien Überlebens der Patienten. In der Literatur wurde aktuell z. B. die negative prognostische Rolle eines *miR-145*-Verlusts bei einem Karzinom (Magenkarzinom) beschrieben (Zhang et al. 2016). Die Expression von *miR-145* im Magenkarzinom ist signifikant herunterreguliert im Vergleich zu normalem Magengewebe. Die Studie zeigt, dass Magenkarzinom-Patienten mit geringer *miR-145*-Expression eine kürzere Gesamtüberlebenszeit aufweisen gegenüber solchen mit hoher *miR-145*-Expression ($p = 0,014$).

Es wäre daher in jedem Falle lohnend, an einem größeren Kollektiv von Patienten mit Meningeomen aller Grade und bekanntem klinischem Verlauf retrospektiv eine statistische Analyse durchzuführen, um festzustellen, ob sich gegebenenfalls die *miR-145* als ein unabhängiger Prognostikator zumindest innerhalb eines WHO-Grades oder für einzelne histologische Subtypen darin entpuppt. So etwas war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da das Institut für Neuropathologie nicht über ein hinreichendes Kollektiv vor allem höhergradiger Meningeome mit bekanntem Verlauf verfügte.

5.1.3 *Mögliche Ursachen des miR-145-Verlusts*

Chromosomale Verluste (LOHs) am *miR-145*-Locus 5q32 bei Meningeomen sind selten. Zwar liegen insgesamt nicht so viele Daten vor wie bei anderen Tumorentitäten - z. B. Gliomen, was die intrakraniellen Tumoren angeht - aber es ist davon auszugehen, dass LOHs an diesem Locus bei Meningeomen selten sind, da sie zudem bei den hochgradigen Tumoren meist nicht beschrieben wurden. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit mit den beiden nächsten, den *miR-145*-Locus flankierenden Mikrosatelliten. Die Tumorigradabhängigkeit der *miR-145* hat nichts mit chromosomalen Stückverlusten zu tun.

Bereits in einer älteren Studie wurden Meningeome aller WHO-Grade mit 24 Mikrosatelliten-Loci untersucht (Lee et al. 2004). Dabei fand sich, wie zu erwarten,

ein Anstieg in der Anzahl der im Mittel betroffenen Loci von WHO-Grad I zu Grad II zu Grad III, aber Chromosom 5 spielte keine wesentliche Rolle.

Eine aktuelle Studie beschäftigt sich mit der Suche nach LOHs, die besonders häufig in rekurrenten Meningeomen auftreten und somit auf Tumorsuppressorgene hindeuten könnten, die eine Rolle für das schnelle Wiederauftreten inkomplett resezierter Meningeome spielen könnten (Och et al. 2016). Die Autoren präsentierten eigene Analysen und eine Meta-Analyse der Literatur und fanden eine Rolle von LOH auf den Chromosomen 1p - dies spielt ebenso eine große Rolle beim Oligodendrogliom - und 14q. Ebenfalls finden sie keine wesentliche Bedeutung von Stückverlusten auf Chromosom 5q.

Bei anderen Tumorerkrankungen bestehen selbstverständlich die Möglichkeit und sogar die Wahrscheinlichkeit, dass ein chromosomaler Stückverlust auf 5q mit entsprechender Deletion des *miR-145*-Gens eine Rolle für den neoplastischen Prozess spielt. Ein Beispiel hierfür wäre das Myelodysplastische Syndrom (MDS). Stückverluste auf 5q deletieren Tumorsuppressoren, die eine wesentliche Rolle für die Entstehung einer MDS spielen. Seit kurzem ist bekannt, dass diese LOHs (die ebenfalls *miR-145* einschließen) u. a. über den Verlust der *miR-145* wirken. D. h. hier gibt es direkt einen Zusammenhang zwischen der Ausschaltung des Tumorsuppressors *miR-145* durch LOH und einem (prä)neoplastischen Prozess, nämlich der MDS (Kumar et al. 2011). In Meningeomen muss jedoch nach anderen Inaktivierungsmechanismen gefahndet werden. Dazu gehören z.B. denkbare epigenetische Modifikationen wie Promotor-Methylierungen und Alterationen der Chromatinstruktur, die beide in dieser Arbeit nicht untersucht werden konnten, jedoch zur Regulation von miRNAs eine Rolle spielen. Promotor-Methylierungen konnten ohne eine Überschreitung des vertretbaren Aufwands in der vorliegenden Arbeit nicht mit Methylierungs-sensitiver PCR (MSP) analysiert werden, weil zum damaligen Zeitpunkt keine plausible Einschränkung weit gestreuter 5'-Regionen und dadurch keine Festlegung auf sinnvolle CpG-Inseln möglich war. Mittlerweile kann es jedoch als geklärt gelten, dass bei anderen Tumorentitäten durchaus Promotormethylierung und -demethylierung die Aktivität des Gens für *miR-145* modulieren, wie dies zu erwarten war (Liu et al. 2017).

Da jüngst eine Regulation der *miR-145* durch den Repressor C/EBP- β beschrieben worden war (Sachdeva et al. 2012), wurde dieser Mechanismus ebenfalls für Meningeome in Erwägung gezogen. Während die Menge dieses Repressors kein zur

Verteilung der miRNA-Menge in den WHO-Graden passendes Muster aufwies, könnte dies eher für das Phosphorylierungsmuster zutreffen. Jedoch scheiterten belastbare Aussagen dazu an der Menge verfügbarer Meningeome, vor allem höheren WHO-Grades, mit hinreichender Gewebemenge für Western Blots. Insgesamt bleibt die Frage nach einer möglichen epigenetischen Regulation folglich künftigen Studien vorbehalten. Denkbar wäre durchaus ein weitgefasstes Screening der Methylierungsmuster in der 5'-Region der *miR-145* an einer kleinen Zahl von Tumoren, um CpG-Regionen für eine MSP in größeren Serien einzugrenzen. Eingrenzende methodische Hinweise könnten inzwischen jedoch außerdem aus der Literatur zur Methylierung bei anderen Tumoren entnommen werden.

Der Versuch, den Verlust von *miR-145* in den hochgradigen Meningeomen über den Transkriptionsfaktor C/EBP- β zu erklären, führte nicht zum Erfolg. Die mRNA des Transkriptionsfaktors C/EBP- β kann in drei unterschiedliche Proteine translatiert werden, Full (LAP*, Leber-aktivierendes Protein, Molekulargewicht von 38 kDa), LAP (35 kDa) und LIP (Leber-inhibierendes Protein, 20 kDa). LAP ist die verbreitetste Isoform. Die beiden langen Isoformen enthalten beide die Transaktivierungs-Domäne, d. h. sie können somit die Transkription eines Zielgens aktivieren. Die ganz kurze Isoform (LIP) enthält die Transaktivierungs-Domäne nicht mehr, wohl aber in identischer Weise die für DNA-Bindung und Dimerisierung nötigen Domänen. LIP wird deshalb als in der Regel inhibitorische Isoform betrachtet, weil dieses Protein kompetitiv die transkriptionsfördernde Wirkung der beiden anderen Isoformen hemmt. Allerdings gibt es selbst für die inhibitorische Wirkung von LIP einzelne Gegenbeispiele, d.h. in einzelnen Testsystemen wirkte LIP offenbar dennoch aktivierend (An et al. 1996; Hu et al. 2000). Trotzdem gilt in der Regel das Verhältnis (Full + LAP)/LIP als aussagekräftigerer Maßstab für die aktivierende Wirkung von C/EBP- β als die reine mRNA-Menge (Real-Time PCR) oder die Protein-Menge der jeweils dominierenden aktivierenden Isoform (Zahnaw 2009). Vorsicht muss jedoch bei der Abschätzung dieses Verhältnisses per Western Blot walten, denn es besteht das Risiko, dass im Zuge der Präparation aktivierende Isoformen proteolytisch soweit degradiert werden, dass sie im Molekulargewicht LIP ähneln und damit verwechselt werden (Baer and Johnson 2000). Die Regulation des Aktivitätslevels von C/EBP- β geschieht primär auf der Ebene der Transkription und auf Ebene der Translation durch Verschiebung in der Nutzung der Initiations-Codons für die langen Isoformen bzw. für die kurze Isoform. Teilweise spielt noch die regulierte Degradation des

Proteins eine Rolle (Pulido-Salgado et al. 2015). Dies alles wären Regulationsmechanismen, die sich in irgendeiner Weise in den Mengen bzw. Mengenverhältnissen der drei Isoformen im Western Blot äußern müssten. In der vorliegenden Arbeit fanden sich jedoch keine Verteilungen dieser Protein-Banden auf die drei WHO-Grade, die das Absinken der *miR-145* in den hochgradigen Tumoren erklären könnte. Obwohl dies nicht als primärer Mechanismus für die Regulation von C/EBP- β betrachtet wird, enthalten die drei Isoformen mehrere phosphorylierbare Aminosäurereste, die z. T. in spezifischen Testsystemen mit dem Aktivitätszustand als Transkriptionsfaktor in Verbindung gebracht wurden. So können z. B. das Serin 276 oder das Threonin 235, die durch entsprechende Protein-Kinasen phosphoryliert werden können, die Aktivität des Transkriptionsfaktors modulieren (Wegner et al. 1992; Marcinkowska et al. 2006; Esteves et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit deutete sich in der begrenzten Zahl für Western Blots verfügbarer Tumoren ein Verlust der Phosphorylierung am Thr-235 der großen, daher in der Regel aktivierenden, Isoformen an. In spezifischen Test-Systemen fördert offenbar die Phosphorylierung dieser Aminosäure die Wirkung als Transkriptionsfaktor (Esteves et al. 2014). Die Interpretation der absinkenden Phosphorylierung an den hochgradigen Meningeomproben bleibt jedoch schwierig. Zum einen ist bislang unklar, welchen Stellenwert generell die Phosphorylierungen besitzen und ob prinzipiell von einem aktivierenden Einfluss auszugehen ist. Zum anderen kommt für die Regulation von *miR-145* die Besonderheit hinzu, dass nach der Arbeit von Sachdeva und Kollegen (Sachdeva et al. 2012), überraschender Weise die großen und kleinen Isoformen beide eine Suppressorfunktion auf die Transkription von *miR-145* ausübten.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass in der Literatur nicht eindeutig immer die großen Isoformen als Aktivatoren und die kleinen als Repressoren definiert werden konnten. Ebenso wenig gab es eine eindeutige Beziehung der Phosphorylierungen zum Funktionszustand dieser Klasse von Transkriptionsfaktoren. Deshalb würde es nicht nur der Untersuchung einer erheblich größeren Zahl von Meningeomen im Western Blot bedürfen, sondern ebenso vertiefter Analysen an Meningeomzellkulturen, bei denen z.B. die Wirkung von shRNA-mediertem Knockdown von C/EBP- β auf die *miR-145*-Expression gemessen wird.

NF2 ist ein eminent wichtiger Tumorsuppressor beim Meningeom, dessen Genprodukt Merlin u. a. als Brückenprotein zwischen subkortikalem Aktin-Zytoskelett

und Membranproteinen fungiert und somit als Faktor bei der Kontaktinhibition, aber ebenfalls für die dynamische Flexibilität des Zytoskeletts und die davon abhängige Zell-Motilität diskutiert wird. Aus diesem Grunde war es in der vorliegenden Arbeit naheliegend, nach einer möglichen quantitativen Korrelation zwischen *NF2*/Merlin und *miR-145* zu suchen, die jedoch nicht gefunden wurde. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass es keinen Zusammenhang zwischen beiden gibt.

5.2 Mögliche durch *miR-145* regulierte Motilitäts-assoziierte Gene

Um potenzielle Signalwege zur Übertragung migrationshemmender Effekte der *miR-145* an hirninvasiven, malignen Meningeomzellen zu finden, wurde ein PCR Array durchgeführt. Eine große Anzahl Zelladhäsions- und Motilitäts-assoziiierter mRNAs wurde zwischen *miR-145*-transfizierten und kontrolltransfizierten IOMM-Lee-Zellen verglichen. Es wurden nur geringe Unterschiede in der Genexpression für fünf Targets beobachtet, wobei *COL5A1* die am stärksten ausgeprägte Herunterregulation in *miR-145*-transfizierten Zellen zeigte. Dieses Gen wurde deswegen als ein indirektes Target vorgeschlagen, das möglicherweise durch *miR-145* auf dem Expressionsniveau reguliert wird. Die *in vitro* Ergebnisse entsprechen dem Nachweis erhöhter *COL5A1*-mRNA-Level in primären Meningeomgeweben mit geringer *miR-145*-Expression. Da die *COL5A1*-mRNA keine Bindungsstelle für *miR-145* in ihrem 3'-untranslatierten Bereich trägt (www.mirbase.org), ist ihre erhöhte Expression möglicherweise nicht auf eine direkte *miR-145*-Wechselwirkung zurückzuführen, sondern stellt wahrscheinlich einen indirekten Effekt der *COL5A1*-Transkriptionsregulation dar. Es ist nicht klar, ob die *COL5A1*-Hochregulation bei malignen Meningeomen tatsächlich durch den Verlust von *miR-145* verursacht wird und welche Rolle sie für die Zelladhäsion und Migration spielen kann. Es wurde gezeigt, dass *COL5A1* für die Kollagenfibrillogenese notwendig ist. Bei Patienten mit Ehlers-Danlos-Syndrom wurden Mutationen im *COL5A1*-Gen identifiziert (De Paepe et al. 1997), welche die Störungen der Kollagenfibrillogenese verursachen (Symoens et al. 2009). Obwohl Mäuse, denen *COL5A1* fehlt, embryonal letal sind, führt heterozygote Deletion zu einem hyperelastischen Phänotyp in mehreren Geweben (Wenstrup et al. 2006). Jedoch wurde die Überexpression von *COL5A1* in humanem Krebs bisher nicht beschrieben und die funktionelle Rolle des erhöhten *COL5A1*-Levels muss bestimmt werden.

Die Kollagene I, III, IV und V sind in Meningeomen exprimiert, was mithilfe von Immunfluoreszenz und Immunelektronenmikroskopie gezeigt wurde. Die Verteilung von Kollagen IV stand in engem Zusammenhang mit der Basalmembran (Nitta et al. 1990). An der Tumor-Hirn-Grenze wurden spindelartige Meningeomzellen beobachtet, die für das Basalmembran-interagierende Glykoprotein SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine; Osteonectin) positiv waren und hochgradige Meningeome enthielten weniger Kollagen IV (Schittenhelm et al. 2006). Kollagen V wurde im fibrösen Septum von meningoethelialen Meningeomen und in Tumorzellen des fibroblastischen Typs gefunden (Nitta et al. 1990). Höhergradige Tumoren wurden dort nicht untersucht. Wohingegen in einem ausgedehnten Screening von sechs anaplastischen Meningeomen gegen drei Hirnhautproben mit High-Density Arrays gefunden wurde, dass in den malignen Meningeomen *COL5A1* geringgradig aber signifikant hochreguliert ist. Das wurde ebenfalls per Real-Time PCR bestätigt (Wang et al. 2012). Die Rolle von *COL5A1* bei der Vermittlung Motilitäts-hemmender Effekte der *miR-145* bleibt somit unklar, aber weiterhin Forschungsgegenstand. Ein anderes Gen wurde jedoch ebenfalls bereits für eine solche Mittlerrolle diskutiert. In der Literatur konnte z. B. ein Zusammenhang für das Aktinfilamente bündelnde Protein Fascin (*FSCN1*) zur Tumorzell-Motilität/ -Malignität und zu *miR-145* gefunden werden (Fuse et al. 2011; Feng et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls ein möglicher Zusammenhang untersucht. Jedoch konnte dieser nicht bestätigt werden. Auf mRNA-Ebene deutete sich zwar ein inverser Zusammenhang zwischen *FSCN1* und *miR-145* an, aber auf Proteinebene gab es keinen sichtbaren Unterschied zwischen den beiden Derivaten der Zelllinie IOMM-Lee.

In einer aktuellen Studie wurde die Expression von *FSCN1* in vier verschiedenen Brustkrebszellen untersucht und diese korrelierte invers mit dem *miR-145*-Level (Zhao et al. 2016). In einer weiteren Studie wurde die Herunterregulation von *miR-145* und die Hochregulation von *FSCN1* in Magenkarzinomzelllinien identifiziert, verglichen wurde hierbei mit normalen Magenschleimhaut-Epithelzellen (Xue et al. 2016). Aufgrund dieser aktuellen Resultate an Karzinomzellen, sollte möglicherweise die aufgetretene Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteinstudien zu Fascin bei malignen Meningeomzellen noch näher untersucht werden, ebenfalls unter Einschluss einer zweiten malignen Meningeomzelllinie mit endogenem niedrigem *miR-*

145-Level, der dann gentechnisch rekonstituiert würde. In Frage käme z. B. die Linie KT21-MG1.

Es gibt noch zwei weitere erwähnenswerte Zielgene von *miR-145*, die eine Motilitätshemmende Wirkung von *miR-145* auf Tumorzellen vermitteln können. Zum einen die ADAM-Proteinfamilie und zum anderen die Kinase ROCK-1. Die ADAM-Proteinfamilie wurde mehrfach mit einer solchen Mittlerrolle zwischen *miR-145* und Motilitäts-Inhibierung in Verbindung gebracht. Das ist interessant, weil ADAM-Proteine sowohl durch ihre Funktion für Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen, als auch durch ihre Metalloproteinase-Eigenschaften mit Tumorzellmotilität und Invasionsfähigkeit assoziiert sind. Beobachtet wurde eine Regulation von ADAM-17 und ADAM-19 durch *miR-145* (Sun et al. 2015; Wu et al. 2015). Gleich mehrfach wurde die Kinase ROCK-1 mit dieser oben genannten Mittlerrolle zwischen *miR-145* und Tumorzellmotilität in Zusammenhang gebracht. Ein Einfluss von *miR-145* auf die Zellmigration via ROCK1 wurde jüngst in einer Arbeit aus dem Jahre 2018 -allerdings an Nicht-Tumorzellen- bestätigt (Chen et al. 2018). ROCK-1 ist ein hochinteressantes Zielgen von *miR-145*, da es an der Signalkette kleiner GTPasen der Rho-Familie beteiligt ist. Diese kleinen GTPasen und damit ROCK-1 sind beteiligt an der raschen Umstrukturierung des Aktin-Zytoskelletts, an der Filopodienbildung und damit an Migrationsvorgängen. Genau wie ADAM-Proteine und FSCN1 ist ebenso ROCK-1 ein besonders beachtenswertes Zielgen in Bezug auf die Motilitätsfunktion (Ding et al. 2016; Zheng et al. 2016a). Neben COL5A1 und FSCN1 wären die ADAM-Proteine und ROCK-1 gute Kandidaten, um die migrations- und invasionshemmende Wirkung von *miR-145*, inklusive der Metastasierungs-Hemmung, zu vermitteln. Zunehmend werden jedoch mehr mögliche, mit Migration und Metastasierung assoziierte Zielgene von *miR-145* identifiziert und es gibt außerdem Hinweise auf gemeinsame Zielgene der beiden co-transkribierten miRNAs des *miR-143/miR-145* Clusters (Lei et al. 2017).

5.3 Therapieversuche *in vivo* mit Cilengitide

Bei Tumorentitäten, bei denen die Hirninvansion ein zentrales Problem der Therapie darstellt, allen voran beim Glioblastom, werden anti-migratorische Therapien intensiv erforscht, so z.B. mit niedermolekularen Integrin-Hemmern. Am weitesten entwickelt und klinisch getestet ist hierbei das Pentapeptid Cilengitide, das sich u. a. durch seine Nebenwirkungs-Armut auszeichnet. Es war in der vorliegenden Arbeit und z. T.

bereits zuvor in der Arbeitsgruppe der Neuropathologie und in der Literatur der Nachweis erbracht worden, dass von Cilengitide erfasste Integrine in Meningeomen vorkommen. Dieser Nachweis schloss neben konventioneller Immunhistochemie an Meningeom-Arrays (siehe Abbildung 31) außerdem Immunfluoreszenz (FACS - fluorescence-activated cell sorting) an benignen und malignen Meningeom-Zelllinien ein (Wilisch-Neumann et al. 2013). Damit war klar erwiesen, dass relevante Integrine ebenfalls auf Meningeomzellen selbst vorkommen und nicht nur in begleitendem Mesenchym oder in Gefäßen. Cilengitide wurde daher ebenfalls am orthotopen Meningeom-Mausmodell auf seine Wirksamkeit getestet.

In der Literatur war Cilengitide auch deshalb als vielversprechende Substanz diskutiert worden, da es Auswirkungen auf die Tumolvaskularisation hatte und zudem dadurch ein Kandidat für zielgerichtete Tumorthherapie war, neben der erhofften Hemmung von Tumorzell-Migration und Invasion (Tabatabai et al. 2011). Klinische Aktivität mit geringen Nebenwirkungen wurden in Phase I und Phase II bei Gliom-Studien beobachtet (Nabors et al. 2007; Stupp et al. 2010) und eine erste klinische Studie in Phase III wurde durchgeführt (Carter 2010). Obwohl Meningeome weit verbreitete intrakranielle Tumoren sind, erhalten sie wenig Aufmerksamkeit aufgrund ihres gutartigen biologischen Verhaltens bei der Mehrheit der Patienten. Deswegen sind keine Daten zur Cilengitide-Empfindlichkeit verfügbar, trotz der Notwendigkeit einer unterstützenden zytostatischen Therapie bei unvollständiger chirurgischer Resektion, atypischen oder anaplastischen Tumoren (Wilisch-Neumann et al. 2013).

5.3.1 *Integrin $\alpha\beta5$ und $\alpha\beta3$ Expression in Meningeomen*

Die Expression der beiden Heterodimere, $\alpha\beta5$ und $\alpha\beta3$ (zwei Zielstrukturen von Cilengitide), wurde zuvor schon in Tumorzellen und neoplastischen Gefäßen in Meningeomen aller WHO-Grade beschrieben (Bello et al. 2000). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit grundlegend bestätigt werden, obwohl hier herausgefunden wurde, dass $\alpha\beta5$ Integrin in den Tumorzellen stark exprimiert wurde, währenddessen $\alpha\beta3$ lediglich in Blutgefäßen zu finden war. Im Gegensatz zu Bello und Kollegen wurden zusätzlich normale Meningen analysiert und es konnte gezeigt werden, dass die Integrinexpression im Tumorgewebe reduziert vorlag, im

Vergleich mit den tumorfreien Meningen. Das wiederum könnte einen Einfluss auf die Wirksamkeit von Cilengitide in Tumorzellen haben.

5.3.2 *Hemmung der Hirninvasion*

Um eine mögliche Auswirkung von Cilengitide bei der Inhibierung der Meningeomentwicklung *in vivo* und einen potentiellen Synergismus mit Bestrahlung *in vivo* zu untersuchen, wie es für Tiere mit Gliomen beschrieben wurde (Yamada et al. 2006; Mikkelsen et al. 2009), sind in der vorliegenden Dissertation subkutane und intrakranielle Meningeom-Mausmodelle genutzt worden. Zunächst wurde mit einer täglichen Dosis von 8 mg/kg Cilengitide begonnen, die abgeleitet war aus einem Behandlungsschema für eine erfolgreiche Wachstumsunterdrückung bei langsam wachsenden Ratten-Gliomen (Yamada et al. 2006). Dieses Behandlungsschema lieferte jedoch keinen Erfolg bei beiden Meningeom-Modellen. Deswegen wurde im nächsten Schritt eine äußerst hohe tägliche Dosis von 75 mg/kg Cilengitide getestet, welche wiederum schon zu Erfolgen bei der Inhibierung der Entwicklung von Brustkrebs-Knochenmetastasen in Ratten geführt hatte (Bäuerle et al. 2011) und laut Literatur die damals höchste an Nagern verwandte und gut tolerierte Dosierung darstellte. Das intrakranielle Meningeomwachstum konnte nicht verlangsamt werden, jedoch wurde die Hirninvasion deutlich unterdrückt. Des Weiteren führte die Doppeltherapie, Radiatio mit Cilengitide, im Vergleich zu der alleinigen Bestrahlung, zu einer nochmaligen Halbierung des Tumolvolumens. Daher ist ein zusätzlicher Vorteil von Cilengitide denkbar, konnte jedoch beim quantitativen Parameter Tumolvolumen nicht statistisch streng nachgewiesen werden. Die Doppelbehandlung war bezüglich des Tumolvolumens signifikant wirksam, die Differenz zur reinen Bestrahlung erreichte jedoch keine Signifikanz. Vor allem aber war der Unterschied anhand der Überlebenszeiten nicht zu erkennen, sodass die Wirkung dieser Substanz kritisch zu betrachten blieb. Als nächstes wurde die Cilengitide-Monotherapie mit der höchstmöglichen Tagesdosis von 75 mg/kg mit langsamer wachsenden malignen KT21-MG1 Zellen durchgeführt. Der Effekt der hochdosierten Monotherapie wurde ebenso bei diesen malignen Meningeomzellen nicht signifikant, da die Streuung der Tumolvolumina im MRT größer war als bei IOMM-Lee Zellen. Insgesamt ist in jüngster Zeit die Skepsis gegenüber Cilengitide zur Hemmung infiltrativ ins Hirn einwachsender Tumoren erheblich gestiegen durch den negativen

Ausgang der großen Studie beim Glioblastom. Das Ergebnis der CENTRIC-Studie (CENTRIC EORTC 26071-22072) zeigte keine Wirksamkeit von Cilengitide (Stupp et al. 2014). Cilengitide wurde zusätzlich zu den etablierten Behandlungen für das Glioblastom getestet (OP, Radiatio und das Zytostatikum Temozolomid). Dabei erreichte die Zusatzbehandlung mit dem Pentapeptid keinerlei Vorteile. Allerdings kommt eine jüngere Nachanalyse dieser sowie einer kleineren Phase-II-Studie insgesamt zu dem Schluss, dass es nicht völlig auszuschließen sei, dass molekularpathologisch enger definierte Subgruppen von Glioblastompatienten mit relevanter Therapieantwort auf Cilengitide künftig noch identifiziert werden könnten (Weller et al. 2016). In dieser Nachanalyse identifizierten ebenso die Expressionslevel der Integrine $\alpha\beta 3$ und $\alpha\beta 5$ allein keine responsiven Patienten. In der Phase-II-Studie war jedoch eine schwache Assoziation einer Untergruppe (unmethylierter MGMT-Promotor) mit besserer Cilengitide-Antwort gefunden worden. Innerhalb dieser Untergruppe könnten z. B. Patienten mit hohem $\alpha\beta 3$ -Level im Tumor in künftigen Versuchs-Kohorten angereichert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse sollte Cilengitide als Therapieoption jedoch nur mit Vorsicht weiter verfolgt werden. Dies betrifft auch das Meningeom. Dennoch sollten weitere mögliche Inhibitor-Therapien oder Antikörper-Therapien, die auf Integrine abzielen, gesucht werden.

5.4 Ausblick

In Bezug auf die Rolle von *miR-145* in Tumoren wurde jüngst an einem Karzinommodell (Pankreaskarzinom) gezeigt (Wang et al. 2016), dass die Rekonstitution der *miR-145*-Expression therapeutisch sein kann. Dieser Befund unterstreicht eine gewisse Verallgemeinerbarkeit der für Meningeom-Xenografts in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Wirkung dieser Rekonstitution. In der Arbeit von Wang und Mitarbeitern tritt der therapeutische Aspekt in gewisser Weise noch deutlicher zu Tage, da es sich um eine direkte Injektion von *miR-145* in die Tumoren handelte. Diese Verfahrensweise unterstützt nicht nur den Befund der Tumorsuppressor-Funktion der miRNA, sondern bringt sie direkt als therapeutische Zielstruktur ins Spiel, deren Nutzbarkeit nicht die Identifikation von Ziel-mRNAs dieses Moleküls voraussetzt. Es sind durchaus relativ gefahrlose virale Genvektoren vorhanden, wie etwa Adeno-assoziiertes Virus (AAV), welche eine Einbringung von Genkonstrukten zur längerfristigen Expression von *miR-145* im Resektionsbett von Tumoren ermöglichen würden. So könnte hypothetisch eine Gentherapie zur Rekonstitution von *miR-145* in atypischen und malignen Meningeomen aufgebaut werden. Diese Therapie könnte abhängig gemacht werden vom individuellen Nachweis einer hinreichend niedrigen *miR-145* Expression im resezierten Tumorgewebe. Dies würde dann eine Zweitoperation für die Gentherapie erforderlich machen. Da Expressionskassetten aus miRNA-Genen mit für kleine RNAs idealen Promotern insgesamt kurz sind, schränkt das geringe Platzangebot der besonders sicheren AAV die gentherapeutische Nutzung von miRNAs nicht ein.

Da der Einsatz von Gentherapie aber selbst bei Vektoren geringen Gefahrenpotenzials immer mit Risiken verbunden und ihre Entwicklung langwierig ist, wäre die Suche nach pharmakologisch angreifbaren Zielproteinen von *miR-145* wahrscheinlich eher zielführend. Dies gilt umso mehr, als die Expression eines typischen Zielproteins einer Tumorsuppressor-miRNA durch deren Verlust ansteigen wird. Bei einem avisierten pharmakologischen Eingriff unterhalb der miRNA-Ebene hätte man es demnach mehrheitlich mit der funktionellen Ausschaltung eines einzelnen Proteins zu tun. Bei zahlreichen onkologisch relevanten miRNA-Zielstrukturen (Rezeptoren, Signalmoleküle, Enzyme) gibt es niedermolekulare Inhibitoren oder es werden solche zunehmend entwickelt. Die Suche nach sinnvollen Zielproteinen der *miR-145*, eventuell mit unvollständigen Erkennungsstellen in ihrer mRNA, bleibt also spannend.

Generell müssen zur Systematisierung der Suche nach miRNA-Zielstrukturen verstärkt bioinformatische Quellen und Computer-Programme eingesetzt werden (Pashaei et al. 2016; Zheng et al. 2016b). Wichtig sind z. B. bioinformatische Werkzeuge, welche die Zielgene einer interessierenden miRNA geordnet nach Signaltransduktionswegen angeben oder bioinformatische Werkzeuge, die umgekehrt anhand des data mining in vorhandenen Expressionsdatenbanken (z. B. GEO datasets, NCBI) aussagen, welche potentiell von einer gegebenen miRNA gleichsinnig regulierten Gene in bestimmten Tumorentitäten ein gleichsinniges Verhalten zeigen. Dies kann z. B. eine verstärkte oder schwächere Expression in hochgradigen Tumoren der Entität oder in metastatischen Fällen sein. Auch auf die letztgenannte Weise gelangt man an Genexpressions-Signaturen, die ein Hinweis auf die wesentliche Wirkung einer bestimmten miRNA in diesen Tumoren sein können.

Bezüglich einer anti-migratorischen Therapie, unabhängig von der Rolle der *miR-145*, legt die oben zitierte (siehe Abschnitt 5.3.2) CENTRIC-Studie zum Glioblastom (Stupp et al. 2014) nahe, weitere Versuche mit Cilengitide einzustellen, jedoch durchaus nach anderen nutzbringenden Integrin-Inhibitoren zu fahnden. Aufgrund ihrer anti-angiogenetischen Wirkung wurden bereits seit langem Antikörper, Peptide und ebenso andere niedermolekulare Inhibitoren entwickelt, die am Integrin $\alpha\beta3$ ansetzen (Liu et al. 2008), das zudem in Meningeomen offenbar vorwiegend in Gefäßen vorkommt. Hingegen ist $\alpha\beta5$ auf den Tumorzellen selbst exprimiert. Daher sollte ein Wirkstoff nicht nur die Angiogenese sondern gleichzeitig die Tumorzellmigration hemmen und die Wirkung von $\alpha\beta5$ blockieren können. Grundsätzlich wären hier andere RGD-Peptide, aber auch niedermolekulare Hemmstoffe vom Nicht-Peptid-Typ denkbar, wie z. B. SB-273005, welches beide erwähnten Dimere *in vitro* sehr effektiv hemmt (<http://www.selleckchem.com/>) und zumindest prinzipiell ebenfalls an Versuchstieren verträglich war (Dalmas Wilk et al. 2013; Wang et al. 2014). Hier müssen weitere Inhibitoren entwickelt und in Tumormodellen erprobt werden.

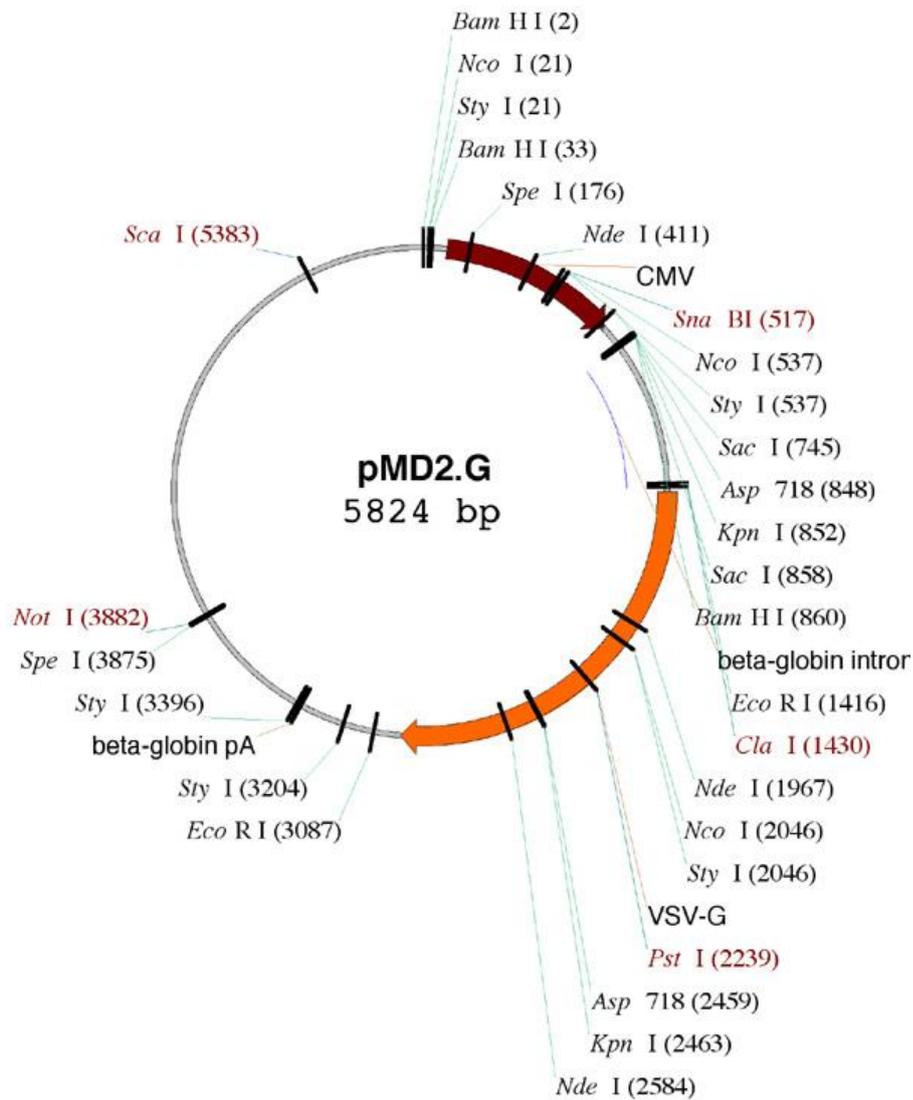


Abbildung 40: Vektorkarte pMD2.G (Addgene, Cambridge, MA, USA).

7 Literatur

- Abedalthagafi M, Bi WL, Aizer AA, et al (2016) Oncogenic PI3K mutations are as common as AKT1 and SMO mutations in meningioma. *Neuro-Oncol* 18:649-655. doi: 10.1093/neuonc/nov316
- Adegbite AB, Khan MI, Paine KW, Tan LK (1983) The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurosurg* 58:51-56. doi: 10.3171/jns.1983.58.1.0051
- Almeida MI, Reis RM, Calin GA (2011) MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutat Res* 717:1-8. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.009
- An MR, Hsieh CC, Reisner PD, et al (1996) Evidence for posttranscriptional regulation of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression during the lipopolysaccharide-mediated acute-phase response. *Mol Cell Biol* 16:2295-2306
- Baer M, Johnson PF (2000) Generation of truncated C/EBPbeta isoforms by in vitro proteolysis. *J Biol Chem* 275:26582-26590. doi: 10.1074/jbc.M004268200
- Bailey CM, Kulesa PM (2014) Dynamic interactions between cancer cells and the embryonic microenvironment regulate cell invasion and reveal EphB6 as a metastasis suppressor. *Mol Cancer Res MCR* 12:1303-1313. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0673
- Barresi V, Vitarelli E, Tuccari G, Barresi G (2011) MMP-9 expression in meningiomas: a prognostic marker for recurrence risk? *J Neurooncol* 102:189-196. doi: 10.1007/s11060-010-0312-8
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297
- Bäuerle T, Komljenovic D, Merz M, et al (2011) Cilengitide inhibits progression of experimental breast cancer bone metastases as imaged noninvasively using VCT, MRI and DCE-MRI in a longitudinal in vivo study. *Int J Cancer* 128:2453-2462. doi: 10.1002/ijc.25563
- Bello L, Zhang J, Nikas DC, et al (2000) Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin expression in meningiomas. *Neurosurgery* 47:1185-1195
- Bernardo BM, Orellana RC, Weisband YL, et al (2016) Association between prediagnostic glucose, triglycerides, cholesterol and meningioma, and reverse causality. *Br J Cancer* 115:108-114. doi: 10.1038/bjc.2016.157
- Beschet I, Brunon J, Scoazec JY, Mosnier JF (1999) Expression of beta1 and beta4 integrins in normal arachnoid membrane and meningiomas. *Cancer* 86:2649-2658

- Brastianos PK, Horowitz PM, Santagata S, et al (2013) Genomic sequencing of meningiomas identifies oncogenic SMO and AKT1 mutations. *Nat Genet* 45:285-289. doi: 10.1038/ng.2526
- Brokinkel B, Hess K, Mawrin C (2017) Brain invasion in meningiomas-clinical considerations and impact of neuropathological evaluation: a systematic review. *Neuro-Oncol* 19:1298-1307. doi: 10.1093/neuonc/nox071
- Burrell K, Agnihotri S, Leung M, et al (2013) A novel high-resolution in vivo imaging technique to study the dynamic response of intracranial structures to tumor growth and therapeutics. *J Vis Exp JoVE* e50363. doi: 10.3791/50363
- Calin GA, Croce CM (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6:857-866. doi: 10.1038/nrc1997
- Carter A (2010) Integrins as target: first phase III trial launches, but questions remain. *J Natl Cancer Inst* 102:675-677. doi: 10.1093/jnci/djq186
- Chamberlain MC, Blumenthal DT (2004) Intracranial meningiomas: diagnosis and treatment. *Expert Rev Neurother* 4:641-648. doi: 10.1586/14737175.4.4.641
- Chamberlain MC, Tsao-Wei DD, Groshen S (2004) Temozolomide for treatment-resistant recurrent meningioma. *Neurology* 62:1210-1212
- Chen M, Zhang Y, Li W, Yang J (2018) MicroRNA-145 alleviates high glucose-induced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells through targeting ROCK1. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 99:81-86. doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.014
- Chiyomaru T, Enokida H, Tatarano S, et al (2010) miR-145 and miR-133a function as tumour suppressors and directly regulate FSCN1 expression in bladder cancer. *Br J Cancer* 102:883-891. doi: 10.1038/sj.bjc.6605570
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159. doi: 10.1006/abio.1987.9999
- Clark VE, Erson-Omay EZ, Serin A, et al (2013) Genomic analysis of non-NF2 meningiomas reveals mutations in TRAF7, KLF4, AKT1, and SMO. *Science* 339:1077-1080. doi: 10.1126/science.1233009
- Curto M, Cole BK, Lallemand D, et al (2007) Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *J Cell Biol* 177:893-903. doi: 10.1083/jcb.200703010
- Curto M, McClatchey AI (2008) Nf2/Merlin: a coordinator of receptor signalling and intercellular contact. *Br J Cancer* 98:256-262. doi: 10.1038/sj.bjc.6604002
- Dalamaga M, Diakopoulos KN, Mantzoros CS (2012) The role of adiponectin in cancer: a review of current evidence. *Endocr Rev* 33:547-594. doi: 10.1210/er.2011-1015

- Dalmas Wilk DA, Scicchitano MS, Morel D (2013) In vitro investigation of integrin-receptor antagonist-induced vascular toxicity in the mouse. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA* 27:272-281. doi: 10.1016/j.tiv.2012.08.028
- De Paepe A, Nuytinck L, Hausser I, et al (1997) Mutations in the COL5A1 gene are causal in the Ehlers-Danlos syndromes I and II. *Am J Hum Genet* 60:547-554
- de Robles P, McIntyre J, Kalra S, et al (2008) Methylation status of MGMT gene promoter in meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 187:25-27. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2008.07.006
- Desgrosellier JS, Cheresh DA (2010) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10:9-22. doi: 10.1038/nrc2748
- Ding W, Tan H, Zhao C, et al (2016) MiR-145 suppresses cell proliferation and motility by inhibiting ROCK1 in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 37:6255-6260. doi: 10.1007/s13277-015-4462-3
- Dumanski JP, Carlom E, Collins VP, Nordenskjöld M (1987) Deletion mapping of a locus on human chromosome 22 involved in the oncogenesis of meningioma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:9275-9279
- Eiring AM, Harb JG, Neviani P, et al (2010) miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell* 140:652-665. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.007
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:259-269. doi: 10.1038/nrc1840
- Esteves CL, Kelly V, Breton A, et al (2014) Proinflammatory cytokine induction of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1) in human adipocytes is mediated by MEK, C/EBP β , and NF- κ B/RelA. *J Clin Endocrinol Metab* 99:E160-168. doi: 10.1210/jc.2013-1708
- Evans DG, Blair V, Strachan T, et al (1995) Variation of expression of the gene for type 2 neurofibromatosis: absence of a gender effect on vestibular schwannomas, but confirmation of a preponderance of meningiomas in females. *J Laryngol Otol* 109:830-835
- Evans DG, Huson SM, Donnai D, et al (1992) A genetic study of type 2 neurofibromatosis in the United Kingdom. I. Prevalence, mutation rate, fitness, and confirmation of maternal transmission effect on severity. *J Med Genet* 29:841-846
- Feng Y, Zhu J, Ou C, et al (2014) MicroRNA-145 inhibits tumour growth and metastasis in colorectal cancer by targeting fascin-1. *Br J Cancer* 110:2300-2309. doi: 10.1038/bjc.2014.122
- Figarella-Branger D, Roche PH, Daniel L, et al (1997) Cell-adhesion molecules in human meningiomas: correlation with clinical and morphological data. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23:113-122

- Fuse M, Nohata N, Kojima S, et al (2011) Restoration of miR-145 expression suppresses cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer by targeting FSCN1. *Int J Oncol* 38:1093-1101. doi: 10.3892/ijo.2011.919
- Galani V, Lampri E, Varouktsi A, et al (2017) Genetic and epigenetic alterations in meningiomas. *Clin Neurol Neurosurg* 158:119-125. doi: 10.1016/j.clineuro.2017.05.002
- Gao P, Xing A-Y, Zhou G-Y, et al (2013) The molecular mechanism of microRNA-145 to suppress invasion-metastasis cascade in gastric cancer. *Oncogene* 32:491-501. doi: 10.1038/onc.2012.61
- Ginzinger DG (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 30:503-512
- Götte M, Mohr C, Koo C-Y, et al (2010) miR-145-dependent targeting of junctional adhesion molecule A and modulation of fascin expression are associated with reduced breast cancer cell motility and invasiveness. *Oncogene* 29:6569-6580. doi: 10.1038/onc.2010.386
- Goutagny S, Nault JC, Mallet M, et al (2014) High incidence of activating TERT promoter mutations in meningiomas undergoing malignant progression. *Brain Pathol Zurich Switz* 24:184-189. doi: 10.1111/bpa.12110
- Grönholm M, Sainio M, Zhao F, et al (1999) Homotypic and heterotypic interaction of the neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein merlin and the ERM protein ezrin. *J Cell Sci* 112 (Pt 6):895-904
- Grosshans H, Johnson T, Reinert KL, et al (2005) The temporal patterning microRNA let-7 regulates several transcription factors at the larval to adult transition in *C. elegans*. *Dev Cell* 8:321-330. doi: 10.1016/j.devcel.2004.12.019
- Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, et al (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352:997-1003. doi: 10.1056/NEJMoa043331
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnol Nat Publ Co* 10:413-417
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnol Nat Publ Co* 11:1026-1030
- Hood JD, Cheresch DA (2002) Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2:91-100. doi: 10.1038/nrc727
- Hu HM, Tian Q, Baer M, et al (2000) The C/EBP bZIP domain can mediate lipopolysaccharide induction of the proinflammatory cytokines interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1. *J Biol Chem* 275:16373-16381. doi: 10.1074/jbc.M910269199

- James MF, Lelke JM, Maccollin M, et al (2008) Modeling NF2 with human arachnoidal and meningioma cell culture systems: NF2 silencing reflects the benign character of tumor growth. *Neurobiol Dis* 29:278-292. doi: 10.1016/j.nbd.2007.09.002
- Ji J, Sundquist J, Sundquist K (2016) Association of tamoxifen with meningioma: a population-based study in Sweden. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP* 25:29-33. doi: 10.1097/CEJ.0000000000000133
- Jiang S-B, He X-J, Xia Y-J, et al (2016) MicroRNA-145-5p inhibits gastric cancer invasiveness through targeting N-cadherin and ZEB2 to suppress epithelial-mesenchymal transition. *OncoTargets Ther* 9:2305-2315. doi: 10.2147/OTT.S101853
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120:635-647. doi: 10.1016/j.cell.2005.01.014
- Jordan VC (2014) Tamoxifen as the first targeted long-term adjuvant therapy for breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 21:R235-246. doi: 10.1530/ERC-14-0092
- Kliese N, Gobrecht P, Pachow D, et al (2013) miRNA-145 is downregulated in atypical and anaplastic meningiomas and negatively regulates motility and proliferation of meningioma cells. *Oncogene* 32:4712-4720. doi: 10.1038/onc.2012.468
- Koo S, Martin GS, Schulz KJ, et al (2012) Serial selection for invasiveness increases expression of miR-143/miR-145 in glioblastoma cell lines. *BMC Cancer* 12:143. doi: 10.1186/1471-2407-12-143
- Kumar MS, Narla A, Nonami A, et al (2011) Coordinate loss of a microRNA and protein-coding gene cooperate in the pathogenesis of 5q- syndrome. *Blood* 118:4666-4673. doi: 10.1182/blood-2010-12-324715
- Kyritsis AP (1996) Chemotherapy for meningiomas. *J Neurooncol* 29:269-272
- La Rocca G, Shi B, Badin M, et al (2009) Growth inhibition by microRNAs that target the insulin receptor substrate-1. *Cell Cycle Georget Tex* 8:2255-2259. doi: 10.4161/cc.8.14.9026
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lee JYK, Finkelstein S, Hamilton RL, et al (2004) Loss of heterozygosity analysis of benign, atypical, and anaplastic meningiomas. *Neurosurgery* 55:1163-1173
- Lee WH (1990) Characterization of a newly established malignant meningioma cell line of the human brain: IOMM-Lee. *Neurosurgery* 27:389-395; discussion 396
- Lei C, Du F, Sun L, et al (2017) miR-143 and miR-145 inhibit gastric cancer cell migration and metastasis by suppressing MYO6. *Cell Death Dis* 8:e3101. doi: 10.1038/cddis.2017.493

- Li J-C, Zheng J-Q (2017) Effect of microRNA-145 on proliferation and apoptosis of human non-small cell lung cancer A549 cells by regulating mTOR signaling pathway. *J Cell Biochem.* doi: 10.1002/jcb.26629
- Li S, Wu X, Xu Y, et al (2016) miR-145 suppresses colorectal cancer cell migration and invasion by targeting an ETS-related gene. *Oncol Rep* 36:1917-1926. doi: 10.3892/or.2016.5042
- Liu S-Y, Li X-Y, Chen W-Q, et al (2017) Demethylation of the MIR145 promoter suppresses migration and invasion in breast cancer. *Oncotarget* 8:61731-61741. doi: 10.18632/oncotarget.18686
- Liu Z, Wang F, Chen X (2008) Integrin alpha(v)beta(3)-Targeted Cancer Therapy. *Drug Dev Res* 69:329-339. doi: 10.1002/ddr.20265
- Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA (2007) Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 449:682-688. doi: 10.1038/nature06174
- Ma L, Weinberg RA (2008) MicroRNAs in malignant progression. *Cell Cycle Georget Tex* 7:570-572. doi: 10.4161/cc.7.5.5547
- Marcinkowska E, Garay E, Gocek E, et al (2006) Regulation of C/EBPbeta isoforms by MAPK pathways in HL60 cells induced to differentiate by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Exp Cell Res* 312:2054-2065. doi: 10.1016/j.yexcr.2006.03.003
- Mas-Moruno C, Rechenmacher F, Kessler H (2010) Cilengitide: The First Anti-Angiogenic Small Molecule Drug Candidate. Design, Synthesis and Clinical Evaluation. *Anticancer Agents Med Chem* 10:753-768. doi: 10.2174/187152010794728639
- Mawrin C, Perry A (2010) Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *J Neurooncol* 99:379-391. doi: 10.1007/s11060-010-0342-2
- Mawrin C, Sasse T, Kirches E, et al (2005) Different activation of mitogen-activated protein kinase and Akt signaling is associated with aggressive phenotype of human meningiomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 11:4074-4082. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2550
- McClatchey AI, Giovannini M (2005) Membrane organization and tumorigenesis--the NF2 tumor suppressor, Merlin. *Genes Dev* 19:2265-2277. doi: 10.1101/gad.1335605
- Mikkelsen T, Brodie C, Finniss S, et al (2009) Radiation sensitization of glioblastoma by cilengitide has unanticipated schedule-dependency. *Int J Cancer* 124:2719-2727. doi: 10.1002/ijc.24240
- Mirimanoff RO, Dosoretz DE, Linggood RM, et al (1985) Meningioma: analysis of recurrence and progression following neurosurgical resection. *J Neurosurg* 62:18-24. doi: 10.3171/jns.1985.62.1.0018

- Nabors LB, Mikkelsen T, Rosenfeld SS, et al (2007) Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 25:1651-1657. doi: 10.1200/JCO.2006.06.6514
- Newton HB (2007) Hydroxyurea chemotherapy in the treatment of meningiomas. *Neurosurg Focus* 23:E11. doi: 10.3171/FOC-07/10/E11
- Niedermaier T, Behrens G, Schmid D, et al (2015) Body mass index, physical activity, and risk of adult meningioma and glioma: A meta-analysis. *Neurology* 85:1342-1350. doi: 10.1212/WNL.0000000000002020
- Nitta H, Yamashima T, Yamashita J, Kubota T (1990) An ultrastructural and immunohistochemical study of extracellular matrix in meningiomas. *Histol Histopathol* 5:267-274
- Niu J, Jiang L, Guo W, et al (2013) The Association between Leptin Level and Breast Cancer: A Meta-Analysis. *PloS One* 8:e67349. doi: 10.1371/journal.pone.0067349
- Nordqvist AC, Smurawa H, Mathiesen T (2001) Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in meningiomas associated with different degrees of brain invasiveness and edema. *J Neurosurg* 95:839-844. doi: 10.3171/jns.2001.95.5.0839
- Obremski VJ, Hall AM, Fernandez-Valle C (1998) Merlin, the neurofibromatosis type 2 gene product, and beta1 integrin associate in isolated and differentiating Schwann cells. *J Neurobiol* 37:487-501
- Och W, Szmuda T, Sikorska B, et al (2016) Recurrence-associated chromosomal anomalies in meningiomas: Single-institution study and a systematic review with meta-analysis. *Neurol Neurochir Pol* 50:439-448. doi: 10.1016/j.pjnns.2016.08.003
- Okada M, Miyake K, Matsumoto Y, et al (2004) Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expressions correlate with the recurrence of intracranial meningiomas. *J Neurooncol* 66:29-37
- Okuducu AF, Zils U, Michaelis SAM, et al (2006) Increased expression of avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 in World Health Organization grade 1 meningiomas is associated with an elevated risk of recurrence and is correlated with the expression of its target genes matrix metalloproteinase-2 and MMP-9. *Cancer* 107:1365-1372. doi: 10.1002/cncr.22130
- Oliveira-Ferrer L, Hauschild J, Fiedler W, et al (2008) Cilengitide induces cellular detachment and apoptosis in endothelial and glioma cells mediated by inhibition of FAK/src/AKT pathway. *J Exp Clin Cancer Res CR* 27:86. doi: 10.1186/1756-9966-27-86
- Orellana EA, Kasinski AL (2015) MicroRNAs in Cancer: A Historical Perspective on the Path from Discovery to Therapy. *Cancers* 7:1388-1405. doi: 10.3390/cancers7030842

- Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, et al (2015) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-Oncol* 17:iv1-iv62. doi: 10.1093/neuonc/nov189
- Pachow D, Andrae N, Kliese N, et al (2013a) mTORC1 inhibitors suppress meningioma growth in mouse models. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 19:1180-1189. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1904
- Pachow D, Andrae N, Kliese N, et al (2013b) mTORC1 inhibitors suppress meningioma growth in mouse models. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 19:1180-1189. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1904
- Pashaei E, Guzel E, Ozgurses ME, et al (2016) A Meta-Analysis: Identification of Common Mir-145 Target Genes that have Similar Behavior in Different GEO Datasets. *PloS One* 11:e0161491. doi: 10.1371/journal.pone.0161491
- Pecina-Slaus N, Cicvara-Pecina T, Kafka A (2012) Epithelial-to-mesenchymal transition: possible role in meningiomas. *Front Biosci Elite Ed* 4:889-896
- Perry A, Gutmann DH, Reifenberger G (2004) Molecular pathogenesis of meningiomas. *J Neurooncol* 70:183-202. doi: 10.1007/s11060-004-2749-0
- Perry A, Scheithauer BW, Stafford SL, et al (1999) "Malignancy" in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications. *Cancer* 85:2046-2056
- Preusser M, Brastianos PK, Mawrin C (2018) Advances in meningioma genetics: novel therapeutic opportunities. *Nat Rev Neurol*. doi: 10.1038/nrneurol.2017.168
- Pulido-Salgado M, Vidal-Taboada JM, Saura J (2015) C/EBP β and C/EBP δ transcription factors: Basic biology and roles in the CNS. *Prog Neurobiol* 132:1-33. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.06.003
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403:901-906. doi: 10.1038/35002607
- Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, et al (2006) MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 24:4677-4684. doi: 10.1200/JCO.2005.05.5194
- Rouleau GA, Wernke W, Haines JL, et al (1987) Genetic linkage of bilateral acoustic neurofibromatosis to a DNA marker on chromosome 22. *Nature* 329:246-248. doi: 10.1038/329246a0
- Sachdeva M, Liu Q, Cao J, et al (2012) Negative regulation of miR-145 by C/EBP- β through the Akt pathway in cancer cells. *Nucleic Acids Res* 40:6683-6692. doi: 10.1093/nar/gks324

- Sachdeva M, Mo Y-Y (2010) MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1. *Cancer Res* 70:378-387. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2021
- Sahm F, Bissel J, Koelsche C, et al (2013) AKT1E17K mutations cluster with meningotheial and transitional meningiomas and can be detected by SFRP1 immunohistochemistry. *Acta Neuropathol (Berl)* 126:757-762. doi: 10.1007/s00401-013-1187-5
- Sathyanarayanan A, Chandrasekaran KS, Karunagaran D (2016) microRNA-145 modulates epithelial-mesenchymal transition and suppresses proliferation, migration and invasion by targeting SIP1 in human cervical cancer cells. *Cell Oncol Dordr*. doi: 10.1007/s13402-016-0307-3
- Saydam O, Shen Y, Würdinger T, et al (2009) Downregulated microRNA-200a in meningiomas promotes tumor growth by reducing E-cadherin and activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mol Cell Biol* 29:5923-5940. doi: 10.1128/MCB.00332-09
- Schittenhelm J, Mittelbronn M, Roser F, et al (2006) Patterns of SPARC expression and basement membrane intactness at the tumour-brain border of invasive meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 32:525-531. doi: 10.1111/j.1365-2990.2006.00761.x
- Schroeder RD, Angelo LS, Kurzrock R (2014) NF2/merlin in hereditary neurofibromatosis 2 versus cancer: biologic mechanisms and clinical associations. *Oncotarget* 5:67-77. doi: 10.18632/oncotarget.1557
- Seizinger BR, Martuza RL, Gusella JF (1986) Loss of genes on chromosome 22 in tumorigenesis of human acoustic neuroma. *Nature* 322:644-647. doi: 10.1038/322644a0
- Shi B, Sepp-Lorenzino L, Prisco M, et al (2007) Micro RNA 145 targets the insulin receptor substrate-1 and inhibits the growth of colon cancer cells. *J Biol Chem* 282:32582-32590. doi: 10.1074/jbc.M702806200
- Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, et al (2014) Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 15:1100-1108. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70379-1
- Stupp R, Hegi ME, Neyns B, et al (2010) Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 28:2712-2718. doi: 10.1200/JCO.2009.26.6650
- Sun Z, Zhang A, Jiang T, et al (2015) MiR-145 suppressed human retinoblastoma cell proliferation and invasion by targeting ADAM19. *Int J Clin Exp Pathol* 8:14521-14527

- Symoens S, Malfait F, Renard M, et al (2009) COL5A1 signal peptide mutations interfere with protein secretion and cause classic Ehlers-Danlos syndrome. *Hum Mutat* 30:E395-403. doi: 10.1002/humu.20887
- Szaniszlo P, Fennewald SM, Qiu S, et al (2014) Temporal characterization of lymphatic metastasis in an orthotopic mouse model of oral cancer. *Head Neck* 36:1638-1647. doi: 10.1002/hed.23500
- Tabatabai G, Tonn J-C, Stupp R, Weller M (2011) The role of integrins in glioma biology and anti-glioma therapies. *Curr Pharm Des* 17:2402-2410
- Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al (2004) Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 64:3753-3756. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0637
- Tanaka K, Sato C, Maeda Y, et al (1989) Establishment of a human malignant meningioma cell line with amplified c-myc oncogene. *Cancer* 64:2243-2249. doi: 10.1002/1097-0142(19891201)64:11<2243::AID-CNCR2820641110>3.0.CO;2-S
- Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, et al (2008) Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 451:147-152. doi: 10.1038/nature06487
- Tufan K, Dogulu F, Kurt G, et al (2005) Intracranial meningiomas of childhood and adolescence. *Pediatr Neurosurg* 41:1-7. doi: 10.1159/000084858
- Tummalapalli P, Spomar D, Gondi CS, et al (2007) RNAi-mediated abrogation of cathepsin B and MMP-9 gene expression in a malignant meningioma cell line leads to decreased tumor growth, invasion and angiogenesis. *Int J Oncol* 31:1039-1050
- Turunen O, Sainio M, Jääskeläinen J, et al (1998) Structure-function relationships in the ezrin family and the effect of tumor-associated point mutations in neurofibromatosis 2 protein. *Biochim Biophys Acta* 1387:1-16
- VanMeter TE, Rooprai HK, Kibble MM, et al (2001) The role of matrix metalloproteinase genes in glioma invasion: co-dependent and interactive proteolysis. *J Neurooncol* 53:213-235
- Wahab M, Al-Azzawi F (2003) Meningioma and hormonal influences. *Climacteric J Int Menopause Soc* 6:285-292
- Wallesch M, Pachow D, Blücher C, et al (2017) Altered expression of E-Cadherin-related transcription factors indicates partial epithelial-mesenchymal transition in aggressive meningiomas. *J Neurol Sci* 380:112-121. doi: 10.1016/j.jns.2017.07.009
- Wang H, Hang C, Ou X-L, et al (2016) MiR-145 functions as a tumor suppressor via regulating angiopoietin-2 in pancreatic cancer cells. *Cancer Cell Int* 16:65. doi: 10.1186/s12935-016-0331-4

- Wang J, Song W, Shen W, et al (2017) MicroRNA-200a Suppresses Cell Invasion and Migration by Directly Targeting GAB1 in Hepatocellular Carcinoma. *Oncol Res* 25:1-10. doi: 10.3727/096504016X14685034103798
- Wang S, Yang J, Wang C, et al (2014) SB-273005, an antagonist of $\alpha\beta 3$ integrin, reduces the production of Th2 cells and cytokine IL-10 in pregnant mice. *Exp Ther Med* 7:1677-1682. doi: 10.3892/etm.2014.1667
- Wang X, Gong Y, Wang D, et al (2012) Analysis of gene expression profiling in meningioma: deregulated signaling pathways associated with meningioma and EGFL6 overexpression in benign meningioma tissue and serum. *PLoS One* 7:e52707. doi: 10.1371/journal.pone.0052707
- Wegner M, Cao Z, Rosenfeld MG (1992) Calcium-regulated phosphorylation within the leucine zipper of C/EBP beta. *Science* 256:370-373
- Weller M, Nabors LB, Gorlia T, et al (2016) Cilengitide in newly diagnosed glioblastoma: biomarker expression and outcome. *Oncotarget* 7:15018-15032. doi: 10.18632/oncotarget.7588
- Wenstrup RJ, Florer JB, Davidson JM, et al (2006) Murine model of the Ehlers-Danlos syndrome. *col5a1* haploinsufficiency disrupts collagen fibril assembly at multiple stages. *J Biol Chem* 281:12888-12895. doi: 10.1074/jbc.M511528200
- Wiemer EAC (2007) The role of microRNAs in cancer: no small matter. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 43:1529-1544. doi: 10.1016/j.ejca.2007.04.002
- Wilisch-Neumann A, Kliese N, Pachow D, et al (2013) The integrin inhibitor cilengitide affects meningioma cell motility and invasion. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 19:5402-5412. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0299
- Winkler F, Kienast Y, Fuhrmann M, et al (2009) Imaging glioma cell invasion in vivo reveals mechanisms of dissemination and peritumoral angiogenesis. *Glia* 57:1306-1315. doi: 10.1002/glia.20850
- Wolf K, Mazo I, Leung H, et al (2003) Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 160:267-277. doi: 10.1083/jcb.200209006
- Wu J, Yin L, Jiang N, et al (2015) MiR-145, a microRNA targeting ADAM17, inhibits the invasion and migration of nasopharyngeal carcinoma cells. *Exp Cell Res* 338:232-238. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.08.006
- Xue M, Zhao L, Yang F, et al (2016) MicroRNA-145 inhibits the malignant phenotypes of gastric carcinoma cells via downregulation of fascin 1 expression. *Mol Med Rep* 13:1033-1039. doi: 10.3892/mmr.2015.4609
- Yamada S, Bu X-Y, Khankaldyyan V, et al (2006) Effect of the angiogenesis inhibitor Cilengitide (EMD 121974) on glioblastoma growth in nude mice. *Neurosurgery* 59:1304-1312; discussion 1312. doi: 10.1227/01.NEU.0000245622.70344.BE

- Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T (2005) Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci* 96:379-386. doi: 10.1111/j.1349-7006.2005.00062.x
- Zahnow CA (2009) CCAAT/enhancer-binding protein beta: its role in breast cancer and associations with receptor tyrosine kinases. *Expert Rev Mol Med* 11:e12. doi: 10.1017/S1462399409001033
- Zang KD (1982) Cytological and cytogenetical studies on human meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 6:249-274
- Zankl H, Zang KD (1972) Cytological and cytogenetical studies on brain tumors. 4. Identification of the missing G chromosome in human meningiomas as no. 22 by fluorescence technique. *Humangenetik* 14:167-169
- Zhang J, Guo H, Zhang H, et al (2011) Putative tumor suppressor miR-145 inhibits colon cancer cell growth by targeting oncogene Friend leukemia virus integration 1 gene. *Cancer* 117:86-95. doi: 10.1002/cncr.25522
- Zhang Y, Wen X, Hu X-L, et al (2016) Downregulation of miR-145-5p correlates with poor prognosis in gastric cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 20:3026-3030
- Zhao H, Kang X, Xia X, et al (2016) miR-145 suppresses breast cancer cell migration by targeting FSCN-1 and inhibiting epithelial-mesenchymal transition. *Am J Transl Res* 8:3106-3114
- Zheng M, Sun X, Li Y, Zuo W (2016a) MicroRNA-145 inhibits growth and migration of breast cancer cells through targeting oncoprotein ROCK1. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 37:8189-8196. doi: 10.1007/s13277-015-4722-2
- Zheng T, Zhang X, Wang Y, Yu X (2016b) Predicting associations between microRNAs and target genes in breast cancer by bioinformatics analyses. *Oncol Lett* 12:1067-1073. doi: 10.3892/ol.2016.4731

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema

**Neue Aspekte der Adhäsion und Migration von Meningeomzellen und ihre
therapeutische Nutzbarkeit**

selbständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an andere Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg/ München, den 23.02.2018

Dipl.-Neurowiss. Nadine Kliese

Publikationsliste

miRNA-145 is downregulated in atypical and anaplastic meningiomas and negatively regulates motility and proliferation of meningioma cells.

Kliese N, Gobrecht P, Pachow D, Andrae N, Wilisch-Neumann A, Kirches E, Riek-Burchardt M, Angenstein F, Reifenberger G, Riemenschneider MJ, Meese E, Panayotova-Dimitrova D, Gutmann DH and Mawrin C.

Oncogene, 32(39):4712-20, 2013.

mTORC1 inhibitors suppress meningioma growth in mouse models.

Pachow D, Andrae N, Kliese N, Angenstein F, Stork O, Wilisch-Neumann A, Kirches E and Mawrin C.

Clin Cancer Res., 19(5):1180-9, 2013.

The integrin inhibitor cilengitide affects meningioma cell motility and invasion.

Wilisch-Neumann A, Kliese N, Pachow D, Schneider T, Warnke JP, Braunsdorf WE, Boehmer FD, Hass P, Pasemann D, Helbing C, Kirches E and Mawrin C.

Clin Cancer Res., 19(19):5402-12, 2013.

Deficiency of the protein-tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ promotes matrix metalloproteinase-9 expression in meningioma cells.

Petermann A, Stampnik Y, Cui Y, Morrison H, Pachow D, Kliese N, Mawrin C and Boehmer FD.

Neurooncol., 122(3):451-9, 2015.