

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Professor Dr. med. M. W. Laschke)

Molekulare Determinanten der nerve/glial antigen (NG)2- Expression im juvenilen Angiofibrom und Glioblastom

Dissertation
zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2024

vorgelegt von
Anne-Sophie Böwe
geboren am 07.04.1995 in Gummersbach

Tag der Promotion: 12.12.2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Werner Laschke

Prof. Dr. Sergiu Groppa

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung	5
3.1	Das Proteoglykan <i>nerve/glia</i> antigen (NG)2	5
3.2	Die Proteinkinase CK2.....	8
3.3	Das juvenile Angiofibrom (JA).....	9
3.4	Das GBM.....	10
3.5	MiRNAs	11
4	Ziele der Arbeit	14
5	Material und Methoden	15
5.1	Zellbiologische Methoden	15
5.1.1	Zellkultur.....	15
5.1.2	Immunfluoreszenz und Immunhistochemie.....	15
5.1.3	CK2-Inhibitoren: CX-4945 und SGC-CK2-1	16
5.1.4	Transiente Transfektion	16
5.1.5	Durchflusszytometrie	17
5.1.6	<i>Scratch</i> -Assay	18
5.1.7	<i>Water-soluble tetrazolium</i> (WST)-1-Assay	18
5.1.8	Transwell-Assay	18
5.1.9	<i>Spheroid sprouting</i> -Assay.....	18
5.1.10	Bromdesoxyuridin (BrdU)-Assay.....	19
5.2	Molekularbiologische Methoden	19
5.2.1	Konstruktion von Reportergenvektoren.....	19
5.2.2	PCR.....	20
5.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	23
5.2.4	Plasmid-Isolierung	23
5.2.5	Restriktion und Dephosphorylierung von Vektoren	23
5.2.6	<i>Gibson assembly</i>	23

5.2.7	Transformation	24
5.2.8	Nachweis der erfolgreichen Klonierung.....	24
5.2.9	Ribonukleinsäure (RNA)-Extraktion	24
5.2.10	Reverse Transkription von Gesamt-RNA und miRNA	25
5.2.11	Quantitative (q)PCR.....	25
5.3	Proteinchemische Methoden	26
5.3.1	Proteinextraktion.....	26
5.3.2	SDS-Gelelektrophorese.....	26
5.3.3	<i>Semi-dry-Blotting</i>	27
5.3.4	CK2-Phosphorylierungs-Assay	28
5.3.5	Luciferase-Reportergenanalyse	29
5.4	Statistische Analyse	29
6	Ergebnisse	30
6.1	Einfluss der CK2-Inhibition auf die NG2-Expression im JA	30
6.1.1	Expression von NG2, CK2 α und CK2 β in primärem JA-Gewebe	30
6.1.2	Expression von NG2, CK2 α und CK2 β in primären JA-Zellen.....	31
6.1.3	CK2-Inhibition reduziert die Zellproliferation von JA-Zellen	33
6.1.4	Einfluss der CK2-Inhibition auf die Expression von NG2 und CK2 in JA-Zellen	36
6.1.5	CK2-Inhibition reduziert die Zellaussprossung von JA-Sphäroiden.....	37
6.1.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	38
6.2	MiR-29b als Regulator der NG2-Expression im GBM	40
6.2.1	Expression von NG2 und miR-29b in humanen Gliomen und GBM-Zellen	40
6.2.2	MiR-29b reduziert die NG2-Expression in humanen GBM-Zellen	41
6.2.3	MiR-29b reduziert posttranskriptionell die NG2-Expression	42
6.2.4	MiR-29b reguliert die NG2-Transkription über Sp1	43
6.2.5	Expression von NG2, miR-29b und PDGFR α in humanen Gliomen.....	45
6.2.6	MiR-29b reduziert die Expression von PDGFR α - und PDGFR β in humanen GBM-Zellen.....	46
6.2.7	MiR-29b reduziert posttranskriptionell die PDGFR α -Expression	47

6.2.8	MiR-29b reduziert die Integrin β 1-Expression in GBM-Zellen.....	48
6.2.9	MiR-29b reguliert ein transmembranes Interaktionsnetzwerk.....	49
6.2.10	MiR-29b reduziert die Proliferation und Migration von humanen GBM-Zellen	51
6.2.11	<i>Long non-coding</i> (lnc)RNA H19 reduziert die miR-29b-Expression.....	55
6.2.12	C-Myc erhöht über H19 und miR-29b die NG2-Expression.....	57
6.2.13	Die Expression von Transmembranproteinen beeinflusst den prognostischen Index in GBM-Subtypen.....	59
6.2.14	Zusammenfassung der Ergebnisse	59
7	Diskussion	61
7.1	Einfluss der CK2-Inhibition auf die NG2-Expression im JA	61
7.1.1	Schlussfolgerung und Ausblick	65
7.2	miR-29b als Regulator der NG2-Expression im GBM	65
7.2.1	Schlussfolgerung und Ausblick	72
8	Literaturverzeichnis.....	74
9	Danksagung	97
10	Publikationen	98
10.1	Originalarbeiten dieser Dissertation	98
10.2	Weitere Originalarbeiten	98
10.3	Zitierfähige Abstracts.....	99
10.4	Nichtzitierfähige Abstracts	99
11	Lebenslauf.....	100

Abkürzungsverzeichnis

AAC	Anaplastisches Astrozytom
AC	Astrozytom
Amp	Ampicillin
ANOVA	Einseitige Varianzanalyse
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BiTE-Antikörper	<i>Bi-specific T-cell engagers</i>
bp	Basenpaar
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CDC	<i>Cell division control protein</i>
CK	Caseinkinase
Clks	<i>Cdc2-like kinases</i>
CSPG	<i>Chondroitin sulfate proteoglycan</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DYRKs	<i>Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinases</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
Egr	<i>Early growth response</i>
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fötales Kälberserum
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glioblastom
Glioma-BioDP	<i>Glioma Bio Discovery Portal</i>
GSK3 β	<i>Glycogen synthase kinase-3 beta</i>
GTP	Guanosintriphosphat
H19	LncRNA H19
HMW-MAA	<i>High molecular weight-melanoma-associated antigen</i>

Abkürzungsverzeichnis

HRP	Meerrettichperoxidase
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
JA	Juveniles Angiofibrom
kb	Kilobasen
KL	Klassisch
lnc	<i>Long non-coding</i>
mAK	Monoklonaler Antikörper
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
Mcl	Myeloisches Leukämie-Zelldifferenzierungsprotein
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MDM2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
MES	Mesenchymal
miR	MicroRNA
miR-29b-Inh	MiR-29b-3p-Inhibitor
miR-29b-Mimic	MiR-29b-3p-Mimic
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
MW	Mittelwert
NE	Neural
NF	<i>Nuclear factor</i>
NG	<i>Nerve/glial antigen</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
ODG	Oligodendrogliom
OPC	Oligodendrozyten-Progenitorzellen
PARP	<i>Poly-ADP-Ribose-Polymerase</i>
Pax	<i>Paired box</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDPN	Podoplanin
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PIP2	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat
PK	Proteinkinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

Abkürzungsverzeichnis

PN	Proneural
pre-miRNA	<i>Precursor miRNA</i>
pri-miRNA	Primäre miRNA
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative PCR
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLU	Relative Lichteinheit
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SCCHN	Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
snRNA	<i>Small nuclear ribonucleic acid</i>
Sp	<i>Specificity protein</i>
TBB	Tetrabromobenzotriazol
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
Tet	Tetrazyklin
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Thr	Threonin
TMZ	Temozolomid
UTR	<i>Untranslated region</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WST	<i>Water-soluble tetrazolium</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

Das Proteoglykan *nerve/glial antigen* (NG)2 wurde erstmals auf humanen Melanomzellen beschrieben und ist heutzutage auch bekannt als *human chondroitin sulfate proteoglycan 4* (CSPG4). Das 300 kDa große Typ-1-Transmembranprotein leistet über Interaktionen mit zahlreichen Proteinen, wie Integrin β 1 und Kollagen, einen essenziellen Beitrag zur transmembranen Signaltransduktion. Die Expression von NG2 ist unter physiologischen Bedingungen auf bestimmte Zelltypen wie Oligodendrozyten-Progenitorzellen und Perizyten beschränkt. Hingegen wird das Proteoglykan unter pathologischen Bedingungen, wie zum Beispiel im benignen juvenilen Angiofibrom (JA) und im malignen Glioblastom (GBM), verstärkt exprimiert. Dabei fördert NG2 maßgeblich die Tumorprogression und steht entsprechend seit Jahren im Fokus der Entwicklung neuer Therapieansätze.

Das JA ist ein seltener benigner Nasopharynx-Tumor, dessen Tumorexstirpation durch intraoperative Komplikationen je nach Stadium erschwert wird. In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die pharmakologische Inhibition der Caseinkinase (CK)2 zu einer reduzierten NG2-Expression führt. Dementsprechend könnte die Hemmung dieser Proteinkinase auch im NG2-exprimierenden JA eine neue Therapiestrategie darstellen. Daher wurde im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit untersucht, ob eine CK2-Inhibition im JA die NG2-Expression sowie die Zellproliferation und Zellmigration reduziert. Zu Beginn wurde die NG2- und CK2-Expression in primären JA-Gewebeproben immunhistochemisch verifiziert. Anschließend wurde in generierten JA-Zellkulturen die Expression von NG2 und CK2 mittels verschiedener molekularer Analysen nachgewiesen. Die Auswirkungen der CK2-Inhibition auf die Zellproliferation und Zellmigration wurden anhand eines *water-soluble tetrazolium* (WST)-1-, Bromdesoxyuridin (BrdU)- und *spheroid sprouting*-Assays untersucht. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Inhibition der CK2 das Zellwachstum und die migratorische Kapazität von JA-Zellen vermindert. Daher stellt die pharmakologische Hemmung der CK2 einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz zur Behandlung des benignen JA dar.

Der förderliche Effekt einer erhöhten NG2-Expression auf die GBM-Tumorprogression ist bis dato gut erforscht. Allerdings sind die zugrundeliegenden genregulatorischen Mechanismen dieser dysregulierten NG2-Expression weitestgehend unbekannt. Bereits in meiner vorangegangenen Masterarbeit konnte auf der Grundlage von *in silico* Analysen die tumorsuppressive microRNA (miR)-29b als möglicher transkriptioneller Regulator der NG2-Expression identifiziert werden. Daher wurde im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit untersucht, inwiefern miR-29b die NG2-Expression reguliert. In ersten quantitativen Polymerasen-Kettenreaktionen (qPCR)-, durchflusszytometrischen und Western Blot-

Analysen wurde eine miR-29b-abhängige Reduktion der NG2-Expression in GBM-Zellen detektiert. Hierbei konnte eine direkte Interaktion der miR-29b mit der NG2-*untranslated region* (UTR) unter Verwendung von Reportergeranalysen festgestellt werden. Neben der posttranskriptionellen Regulation von NG2 wurde zusätzlich gezeigt, dass die miR-29b über den Transkriptionsfaktor *specificity protein* (Sp)1 die NG2-Expression indirekt beeinflusst. Eine miRNA reguliert häufig die Expression von Proteinen mit ähnlicher zellulärer Funktion. Daher wurden als nächstes Interaktionspartner von NG2 als putative miR-29b Zielmoleküle untersucht. Detaillierte molekulare Analysen zeigten, dass die miR-29b auch die Expression der Transmembranproteine Integrin β 1, *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) α und PDGFR β in GBM-Zellen posttranskriptionell reduziert. In weiteren *in vitro* Untersuchungen wurde der Einfluss der miR-29b auf proliferative und migratorische Prozesse mittels WST-1, Transwell-, *scratch*- und *spheroid sprouting*-Assays analysiert. Interessanterweise zeigten die durchgeführten funktionellen Analysen, dass die miR-29b-abhängige Regulation des NG2-Netzwerks die Proliferation und Migration von GBM-Zellen reduziert. Die Untersuchungen verschiedener Signalwege ergaben, dass diese Effekte auf eine verringerte *extracellular-signal regulated kinase* (ERK)1/2-Aktivität zurückzuführen sind. Zusätzlich wurden die regulatorischen Mechanismen der miR-29b-Expression analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die beiden Onkogene *long non-coding* (lnc)RNA H19 und c-Myc als negative Regulatoren der miR-29b im GBM fungieren und somit die NG2-Expression stimulieren. Zusammenfassend konnte im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit der regulatorische Mechanismus der NG2-Expression in Abhängigkeit der miR-29b entschlüsselt werden. Dementsprechend könnten auf Basis der miR-29b neue therapeutische Strategien zur Behandlung des NG2-positiven GBM entwickelt werden.

2 Summary

Molecular determinants of nerve/glia antigen (NG)2 expression in juvenile angiofibroma and glioblastoma

The proteoglycan nerve/glia antigen (NG)2 was first described on human melanoma cells and is also known as human chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4). The 300 kDa type 1 transmembrane protein contributes significantly to transmembrane signal transduction via interactions with numerous proteins, such as integrin β 1 and collagen. Under physiological conditions, the expression of NG2 is restricted to certain cell types, such as oligodendrocyte progenitor cells and pericytes. In contrast, the proteoglycan is strongly expressed under pathological conditions, such as in benign juvenile angiofibroma (JA) and malignant glioblastoma (GBM). NG2 significantly promotes tumor progression and has therefore been in the focus of the development of new therapeutic approaches for years.

JA is a rare benign nasopharyngeal tumor whose tumor extirpation is often associated with intraoperative complications depending on the stage. Previous work has already shown that pharmacological inhibition of casein kinase (CK)2 leads to reduced NG2 expression. Accordingly, inhibition of this protein kinase may represent a new therapeutic strategy in NG2-expressing JA. Therefore, the first part of the present thesis investigated whether CK2 inhibition in JA reduces NG2 expression as well as cell proliferation and cell migration. Initially, NG2 and CK2 expression in primary JA tissue samples was verified by immunohistochemistry. Subsequently, the expression of NG2 and CK2 was detected in generated JA cell cultures using various molecular analyses. The effects of CK2 inhibition on cell proliferation and cell migration were investigated using water-soluble tetrazolium (WST)-1, bromodeoxyuridine (BrdU) and spheroid sprouting assay. It was found that inhibition of CK2 decreases cell growth and migratory capacity of JA cells. Therefore, pharmacological inhibition of CK2 represents a promising therapeutic approach for the treatment of benign JA.

The impact of an increased NG2 expression on GBM tumor progression has been well studied to date. However, the underlying gene regulatory mechanisms of this dysregulated NG2 expression are largely unknown. In my previous master thesis, the tumor suppressive microRNA (miR)-29b has already been identified as a possible transcriptional regulator of NG2 expression based on *in silico* analyses. Therefore, the second part of the present thesis investigated whether miR-29b regulates NG2 expression. Initial quantitative polymerase chain reactions (qPCR), flow cytometric and Western blot analyses revealed a miR-29b-dependent reduction of NG2 expression in GBM cells. A direct interaction of miR-29b with the NG2-untranslated region (UTR) was verified using reporter gene analyses. In addition to the post-transcriptional regulation of NG2, it was also shown that miR-29b indirectly influences NG2

expression via the transcription factor specificity protein (Sp)1. A miRNA often regulates the expression of proteins with similar cellular function. Therefore, interaction partners of NG2 were investigated as potential miR-29b targets. Detailed molecular analyses revealed that miR-29b post-transcriptionally regulates also the expression of the transmembrane proteins integrin β 1, platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) α and PDGFR β in GBM cells. In additional *in vitro* studies, the influence of miR-29b on proliferative and migratory processes was analyzed using WST-1, transwell, scratch and spheroid sprouting assays. Interestingly, these functional analyses showed that miR-29b-dependent regulation of the NG2 network reduces the proliferation and migration of GBM cells. Investigations of different signaling pathways revealed that these effects are due to a reduced extracellular-signal regulated kinase (ERK)1/2 activity. In addition, the regulatory mechanisms of miR-29b expression were analyzed. It was found that the two oncogenes long non-coding (lnc)RNA H19 and c-Myc act as negative regulators of miR-29b in GBM and therefore stimulate NG2 expression. In summary, the regulatory mechanisms of NG2 expression in dependence of miR-29b could be determined in the second part of the present thesis. Accordingly, new therapeutic strategies for the treatment of NG2-positive GBM tumors may be developed on the basis of miR-29b.

3 Einleitung

3.1 Das Proteoglykan *nerve/glia antigen (NG)2*

Vor über 40 Jahren wurde auf humanen Melanomzellen erstmals das *high molecular weight-melanoma-associated antigen* (HMW-MAA), heutzutage bekannt als NG2 oder auch als *human chondroitin sulfate proteoglycan* (CSPG)4, beschrieben [1]. Im gleichen Jahr wurde das Ortholog des humanen NG2 auf Gliazellen im Rattengehirn entdeckt [2]. Die NG2-Gensequenz blieb über die phylogenetische Entwicklung konserviert, wodurch die NG2-Aminosäuresequenzen der Maus und Ratte zu 80 % identisch zur humanen Aminosäuresequenz sind [3]. Das auf Chromosom 15q lokalisierte NG2-Gen codiert ohne bekannte alternative Spleißvarianten ein funktionelles Typ-1-Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 300 kDa [4, 5]. Dieses Protein besteht aus drei strukturellen Domänen: Einer 2225 Aminosäuren (AS) großen extrazellulären Domäne, die 95 % des Proteins ausmacht, einer Transmembrandomäne aus 25 AS und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne aus 75 AS (*Abbildung 1*) [6]. Aufgrund seiner charakteristischen Kernproteinstruktur mit extrazellulären sulfatierten Glykosaminoglykan (GAG)-Seitenketten gehört NG2 zur Proteinfamilie der Chondroitinsulfat-Proteoglykane [5]. Besonders die extrazelluläre Domäne, welche in die drei Subdomänen D1, D2 und D3 unterteilt wird, zeichnet sich durch strukturelle und funktionelle Motive aus [7]. Die posttranslationale Modifikation der Subdomäne D2 mit GAG-Ketten ermöglicht die Interaktion mit Kollagen Typ V und VI, die Disulfidbrücken der D1-Subdomäne stabilisieren die Tertiärstruktur und die D3-Subdomäne interagiert unter anderem mit Integrin $\alpha 3\beta 1$ und besitzt mehrere proteolytische Schnittstellen [3, 8]. Der zytoplasmatische Carboxy-Terminus mit einer PDZ-Domäne, einer Prolin-reichen Region und mehreren Threonin (Thr)-Phosphoakzeptor-Stellen ermöglicht die Interaktion mit Syntenin, Proteinkinase (PK)C- α und *extracellular-signal regulated kinase* (ERK)1/2 [9, 10].

Ähnlich zu anderen transmembranen Proteoglykanen, wie CD44, Syndecane und Integrinen, besitzt NG2 keine eigene katalytische Aktivität [11-14]. Der strukturelle Aufbau von NG2 ist daher essenziell für dessen funktionelle Wirkung. Zum Beispiel initiiert das NG2-Kernprotein durch die Bindung des *basic fibroblast growth factor* (bFGF) oder des *platelet-derived growth factor* (PDGF) α die Präsentation dieser Wachstumsfaktoren an die entsprechenden Rezeptoren [14-16]. Zusätzlich zu Kollagen Typ V und VI interagiert die extrazelluläre Domäne von NG2 mit Laminin und Fibronectin und verknüpft damit Komponenten der extrazellulären Matrix mit dem intrazellulären Signaling [7, 14, 17]. Außerdem stimulieren die Phosphorylierungen der intrazellulären Thr-Phosphorakzeptorstellen durch ERK (Thr²²⁵⁶) und PKC- α (Thr²³¹⁴) und eine anschließende Interaktion mit Integrin $\beta 1$ und dem Aktin-Zytoskelett die Zellproliferation und Zellmigration [5, 10, 18].

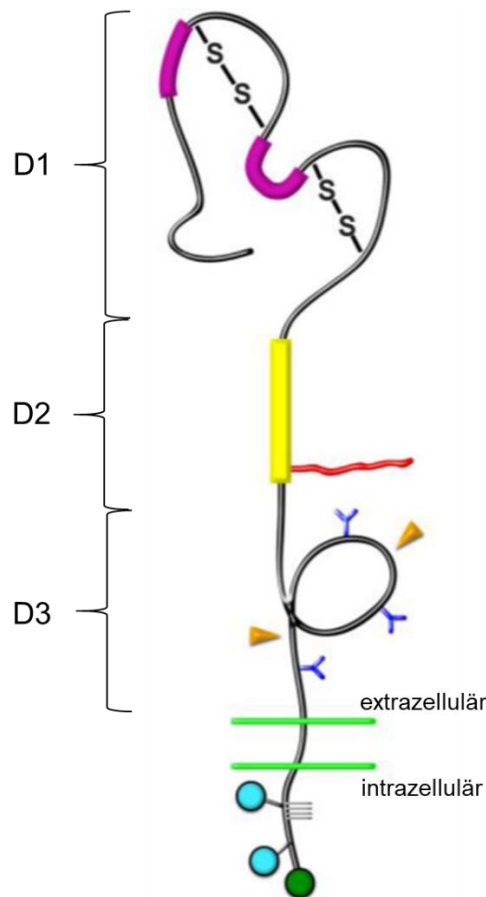


Abbildung 1: Schematische Struktur des Proteoglykans NG2. Das Transmembranprotein NG2 besteht aus einer extrazellulären Domäne, einer transmembranen Domäne und einer zytoplasmatischen Domäne. Die extrazelluläre Domäne wird in die Subdomänen D1, D2 und D3 unterteilt. Die D1-Subdomäne besitzt mehrere Disulfidbrücken und Laminin-Domänen (magenta). In der D2-Subdomäne ist eine Kollagen-Bindedomäne (gelb) und eine sulfatierte GAG-Seitenkette an Serin-999 (rot) lokalisiert. Die Subdomäne D3 besitzt mehrere proteolytische Schnittstellen (orange Pfeile) und mehrere N-Glykosylierungen (blaue Y). In der intrazellulären Domäne sind zwei Thr-Phosphoakzeptor-Stellen (Thr-2256 und Thr-2314; blaue Kreise), eine Prolin-reiche Region (hellgraue Striche) und eine C-terminale PDZ-Domäne (grüner Kreis) lokalisiert. Modifiziert nach Stallcup et al. [19].

Die Expression von NG2 wurde zunächst auf Vorläuferzellen neuralen, epidermalen oder mesenchymalen Ursprungs, wie Oligodendrozyten-Progenitorzellen (OPC), Osteoblasten, Keratinozyten oder Chondroblasten, gezeigt, allerdings wird das Proteoglykan auch verstärkt im Pankreas, der Leber, der glatten Muskulatur des Knochenmarks und in Perizyten exprimiert [5, 20-24]. In den Vorläuferzellen übernimmt NG2 eine wichtige Funktion während der Differenzierung, wobei dessen Expression reprimiert wird, sobald der reife Zellstatus erreicht ist [4, 25]. Obwohl NG2 auch verstärkt während der Embryonalentwicklung exprimiert wird, zeigten NG2-Knockout-Mäuse keinen letalen Phänotypen, jedoch resultierte der Verlust in Defiziten der Geweberegeneration sowie in einer Steigerung von degenerativen und neoplastischen Pathologien [26]. Zusätzlich wurden Entwicklungsdefekte des neurovaskulären Systems auf den Verlust des Proteoglykans in Perizyten zurückgeführt, wodurch die essenzielle Funktion von NG2 im Blutgefäßsystem verdeutlicht wird [27, 28]. Eine verstärkte NG2-Expression wird außerdem mit verletzungsbedingten Entzündungen und neurodegenerativen Erkrankungen, wie Multipler Sklerose und Alzheimer, in Verbindung

gebracht [20, 29-31]. Zudem fördert NG2 die onkogene Progression sowohl in Tumoren neuroektodermalen Ursprungs, wie im Glioblastom (GBM) und Oligodendrogliom, als auch im triple-negativen Mammakarzinom und Plattenepithelkarzinom [14, 32, 33]. Aufgrund seines spezifischen Expressionsprofils dient NG2 als Marker für Zellpopulationen mit einem starken proliferativen und angiogenen Potential [4, 14, 21].

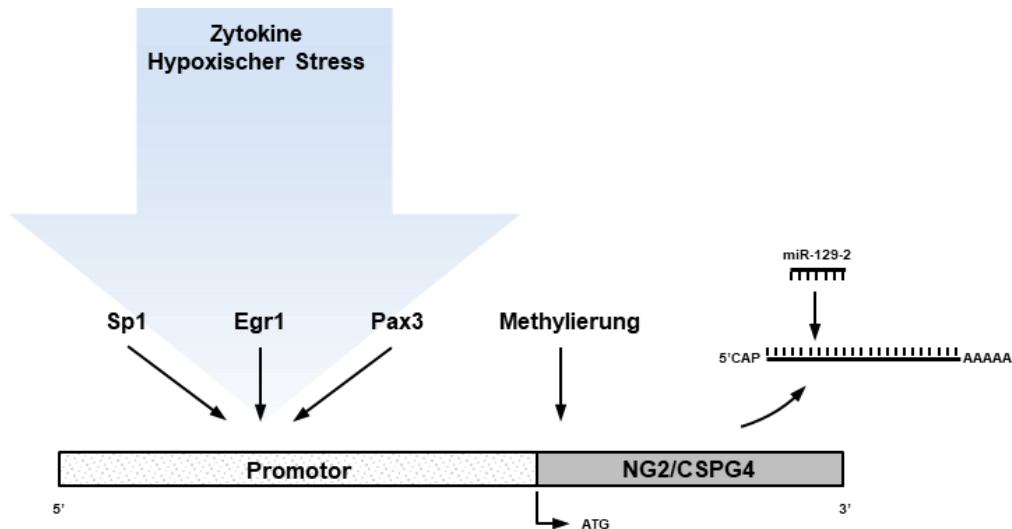


Abbildung 2: Regulatorische Faktoren der NG2-Expression. Inflammatorische Zytokine und Hypoxie fördern die NG2-Expression. Im Gegensatz dazu wird die Transkription durch Methylierungen im NG2-Promotorbereich epigenetisch inhibiert. Auf transkriptioneller Ebene stimulieren die Transkriptionsfaktoren *specificity protein* (Sp)1, *early growth response* (Egr)1 und *paired box* (Pax)3 die Expression von NG2. Zusätzlich wird die NG2-mRNA posttranskriptionell durch die miR-129 reguliert. Modifiziert nach Ampofo et al. [21].

Obwohl das Proteoglykan während der Tumorprogression mehrere onkogene Signalwege aktiviert, wie den Integrin-regulierten FAK-Signalweg und die Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK)/*mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Kaskade mit ERK1/2 als downstream Effektor, wird NG2 allgemein nicht als Onkogen klassifiziert [14]. Jedoch gibt es zahlreiche Studien, die NG2 als potenzielles Zielmolekül für die Therapie von Melanomen, Weichteilsarkomen, Plattenepithelkarzinomen und Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) in Betracht ziehen [14, 22]. Dafür ist es essenziell, die molekularen Regulationsmechanismen von NG2 genauer zu betrachten, um mögliche therapeutische Ansatzpunkte zu identifizieren. Zum einen fördern inflammatorische Zytokine die Proteoglykan-Expression auf NG2-positiven Zellen im ZNS, zum anderen verstärkt eine Hypoxie-induzierte Angiogenese die NG2-Expression auf Perizyten [21, 34, 35]. Bei der Betrachtung der direkten Genregulation kann die NG2-Expression durch mehrere CpG-Insel-Hypermethylierungen im Bereich des Promotors epigenetisch stumm geschaltet werden [36]. Studien konnten bereits zeigen, dass die Reduktion dieser Promotormethylierung in Melanom-Zelllinien, melanozytären Läsionen und im Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region (SCCHN) verantwortlich für die verstärkte NG2-Expression ist, welche wiederum die Tumorprogression begünstigt [36, 37]. Auf Transkriptionsebene konnte kürzlich eine 114 bp

große Promotorregion des humanen NG2-Gens identifiziert werden, welche transkriptionell vermutlich über die Proteinkinase Caseinkinase (CK)2 reguliert wird und somit die NG2-Expression in Perizyten und im GBM beeinflusst (*Abbildung 2*) [38, 39]. Zudem kann die NG2-Expression posttranskriptionell über die microRNA (miR)-129 reduziert werden [39, 40].

3.2 Die Proteinkinase CK2

Die Proteinkinase CK2 ist eine der ersten identifizierten Proteinkinasen, die mit über 400 Substraten einen maßgeblichen Beitrag zum humanen Phosphoproteom leistet [41, 42]. Sie ist konstitutiv aktiv, ubiquitär exprimiert und phosphoryliert Substrate mit der Konsensussequenz S/T-XX-E/D/pS (S: Serin; T: Threonin; X: beliebige Aminosäure; E: Glutamin; D: Asparaginsäure; p: phosphoryliert) [43, 44].

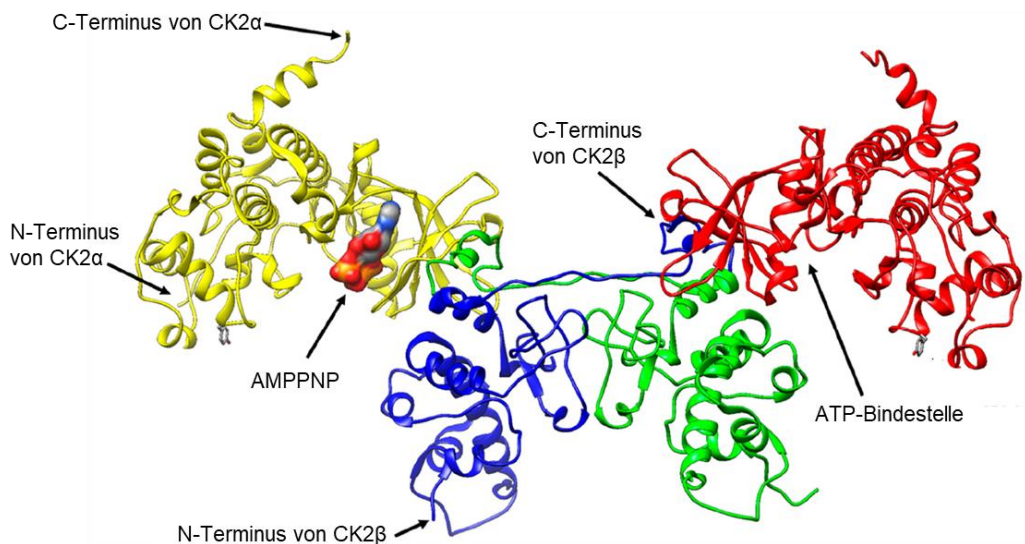


Abbildung 3: Strukturelles Bändermodell der Proteinkinase CK2. Das Holoenzym CK2 besteht aus den zwei katalytischen α -Untereinheiten (gelb und rot) und zwei regulatorischen β -Untereinheiten (blau und grün). Die β -Untereinheiten bilden ein Dimer und binden jeweils eine katalytische α -Untereinheit. Das Adenosinriphosphat-Analogon Adenosin-5'-(β,γ -imido)Triphosphat (AMPPNP) bindet in der ATP-Bindungstasche der katalytischen α -Untereinheit. Modifiziert nach Nienberg [45].

Die CK2 ist ein Heterotetramer bestehend aus den zwei katalytischen Untereinheiten α und α' , codiert durch die Gene CSNK2A1 bzw. CSNK2A2, und zwei regulatorischen β -Untereinheiten, codiert durch das Gen CSNK2B (*Abbildung 3*) [46-48]. Die α - und α' -Untereinheiten der Kinase können auch als Monomere katalytisch aktiv sein, wohingegen sich die Funktion der regulatorischen β -Untereinheiten auf die Erhaltung der Enzymstabilität und die Substratselektion beschränkt [49]. Jedoch ist die Aktivität und Funktionalität aller CK2-Untereinheiten besonders bei der Embryogenese von essenzieller Relevanz [50]. Sowohl ein Knockout der α - als auch der β -Untereinheiten führt in Mäusen zu embryonaler Letalität, wohingegen ein Knockout der CK2 α' zwar zu lebensfähigen, aber infertilen männlichen Mäusen führt [51-53].

Neben der Interaktion mit Rezeptoren und Kanälen beeinflusst die CK2 über die Signalwege *nuclear factor* (NF)- κ B-, *phosphatase and tensin homolog* (PTEN)/PI3K/AKT- und Wnt/ β -Catenin sowie über die Phosphorylierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren, wie p53 und *specificity protein* (Sp)1, die Expression verschiedener Gene und stimuliert so zelluläre Prozesse der Inflammation, der Angiogenese, des Zellüberlebens, der Zellproliferation und der Zellmigration [54-60]. Dementsprechend geht eine dysregulierte CK2-Aktivität mit neurodegenerativen und kardiovaskulären Erkrankungen, Infektionen sowie Autoimmun- und Krebserkrankungen einher [42]. Im Falle von Krebserkrankungen konnte eine pro-onkogene Funktion der CK2 im GBM, Medulloblastom, Brustkrebs, Plattenepithelkarzinom und in mehreren Leukämie-Typen nachgewiesen und mit einer zentralen Rolle in der Tumorentwicklung sowie einer schlechten Prognose in Zusammenhang gebracht werden [42, 61, 62]. Dabei phosphoryliert die CK2 tumorassoziierte Proteine und verstärkt onkogene Signalkaskaden [42, 63]. So beeinflusst sie beispielsweise über Signalwege, wie PTEN/PI3K/AKT und MAPK/ERK, den Prozess der Tumorangiogenese [64-66]. Daher wird die CK2-Inhibition derzeit als möglicher Therapieansatz bei der Behandlung verschiedener Tumore in Betracht gezogen [42, 67, 68].

Über die letzten 20 Jahre wurden mehrere CK2-Inhibitoren identifiziert, welche die Apoptose fördern und der Proliferation, Migration und Angiogenese entgegenwirken [38, 39, 42, 69]. Die Mehrheit dieser Inhibitoren wirkt kompetitiv und blockiert die Adenosintriphosphat (ATP)- oder Guanosintriphosphat (GTP)-Bindestelle der katalytischen CK2-Untereinheiten, wie 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB) und CX-4945 [70, 71]. CX-4945 befindet sich bereits als orales Pharmakon in klinischen Phase 1 und 2 Studien zur Behandlung verschiedener Tumore (NCT01199718, NCT00891280, NCT03897036, NCT02128282, NCT03904862, NCT03571438) [42]. Jedoch weisen die aktuellen klinischen CK2-Inhibitoren unerwünschte Off-Target-Effekte auf, sodass weiterhin neue Hemmstoffe synthetisiert und analysiert werden, wie zum Beispiel der selektivere CK2-Inhibitor SGC-CK2-1 [72].

3.3 Das juvenile Angiofibrom (JA)

Das JA ist ein benigner Nasopharynx-Tumor, der mit einer Häufigkeit von 0,05 % aller Hals-Nasen-Ohren-Tumoren nahezu ausschließlich beim männlichen Geschlecht zwischen dem 10. und 25. Lebensjahr auftritt [73, 74]. Obwohl das JA histologisch als gutartig klassifiziert wird, kann das aggressive lokale Wachstum eines JA des Stadiums III zu einer Erosion der Schädelbasis mit intrakranieller Ausdehnung führen [73, 75].

Die zelluläre Ätiologie und Pathogenese des JA ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch sprechen viele Studien von einer Tumorentwicklung ausgehend von dem Foramen sphenopalatinum [73, 76]. Dort bildet sich ein Tumor mit einem ausgedehnten Blutgefäßsystem aus, welches von einem dichten Netzwerk aus Fibroblasten und Kollagen

umgeben ist [73, 77, 78]. Besonders bei der primären Therapiestrategie, der vollständigen operativen Tumorexstirpation, erhöht das ausgedehnte vaskuläre System das Risiko von intraoperativen Blutungen [76]. Zwar ermöglichen bildgebende Diagnoseverfahren eine sehr gute Therapie bei frühem Befund, jedoch wird aufgrund der zunächst harmlosen Symptome, wie nasaler Obstruktion und Epistaxis, das JA meist erst in späteren Stadien diagnostiziert [79]. So werden bei JA-Tumoren mit intrakranieller Invasion sowie wiederkehrenden Tumoren oder Residual-Tumoren an chirurgisch unzugänglichen anatomischen Stellen bereits alternative Therapiestrategien, wie Strahlentherapie, Hormontherapie und Embolisation, eingesetzt, um das hohe Risiko an Komplikationen während der operativen Tumorexstirpation zu umgehen [76]. Ein weiterer therapeutischer Ansatz ist die Verwendung von Zytostatika für die gezielte Inhibition von proliferativen und angiogenen Zielmolekülen.

Zwar konnte in diesem Kontext bereits eine verstärkte Expression des zuvor erwähnten Proteoglykans NG2 in JA-Gewebe nachgewiesen werden, jedoch wurde dessen Einfluss auf die Tumorprogression nicht analysiert [78]. Eine direkte pharmakologische Inhibition des proliferativen und angiogenen Transmembranproteins wird durch das fehlende katalytische Zentrum erschwert [5, 80]. Eine Alternative wäre die indirekte pharmakologische Inhibition von NG2 über die Proteinkinase CK2. Studien der letzten Jahre zeigten, dass die CK2 die NG2-Expression fördert und eine CK2-Inhibition mit einer Reduktion der NG2-Expression, der Zellproliferation, der Zellmigration sowie der Angiogenese in GBM-Zellen und Perizyten einhergeht [38, 39]. Aufgrund dieser Studien könnte das Proteoglykan und die CK2 nicht nur im malignen GBM, sondern auch im benignen NG2-positiven JA eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und Angiogenese der JA-Progression spielen und die CK2-Inhibition einen neuen pharmakologischen Therapieansatz bieten.

3.4 Das GBM

Das GBM ist mit einer weltweiten Inzidenz von ~4 Neuerkrankungen pro 100.000 Personen pro Jahr der häufigste astrozytäre Tumor des ZNS [81-83]. Bei Erwachsenen tritt das GBM hauptsächlich in den Großhirnhemisphären im Durchschnittsalter von 60 Jahren auf [83-85]. Nach der initialen Diagnose beträgt trotz multimodaler Therapie mit chirurgischer Resektion, adjuvanter Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) und Radiotherapie die mittlere Überlebenszeit lediglich 15 Monate und die 5-Jahres-Überlebensrate nur 5,4 % [83, 84, 86]. Nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO)-Klassifizierung wird das GBM mit dem Genotyp Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) Wildtyp als Grad IV Tumor eingeteilt [87]. Ein fortgeschrittenes Oligodendrogliom oder Astrozytom mit IDH-Mutation wird nach der neuen WHO-Einteilung als Oligodendrogliom Grad II/III bzw. Astrozytom Grad IV Tumor klassifiziert und nicht mehr als sekundäres Glioblastom (Grad IV) eingestuft [87-89]. Zu den typischen histologischen Charakteristika des GBM zählen zellulärer Polymorphismus, ein hoher Mitoseindex,

Kernatypien, strichförmige Nekrose sowie vaskuläre Hyperplasie [86, 90]. Dabei fördern nekrotischen Zellen die Entstehung eines hypoxischen Tumormikromilieus, welches wiederum durch Sekretion angiogener Faktoren die Neovaskularisierung anregt sowie die diffuse, invasive Tumordinfiltration in umliegende nährstoffreiche Areale fördert [86, 91]. Zudem wird die Hochregulation zahlreicher onkogener Signalwege wie NF- κ B, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *epidermal growth factor receptor* (EGFR), *transforming growth factor* (TGF)- β und PI3K/AKT/*mechanistic target of rapamycin* (mTOR) mit der GBM-Pathogenese und dem aggressiven Tumorverhalten in Verbindung gebracht [92-97].

Trotz jahrzehntelanger Forschung verdeutlicht die unumgängliche Rezidiventwicklung nach durchschnittlich 7 Monaten den dringenden medizinischen Bedarf der Integration neuer Therapieansätze, um die zytotoxische Wirkung der aktuellen Standardtherapie zu verstärken [86, 97]. Jedoch ist die Pathogenese von malignen Gliomen selten ausschließlich von einem Onkogen oder Tumorsuppressor abhängig, was wiederum die optimierbare Effizienz von aktuellen klinischen Studien erklärt, welche sich nur auf einen molekularen Faktor fokussieren [97]. Zudem erschweren Faktoren wie der stammzellähnliche Charakter des GBM, die zelluläre Heterogenität, genetische und epigenetische Modifikationen sowie Resistenzmechanismen gegen Chemotherapeutika, Strahlentherapie und Immuntherapie die Entwicklung neuer Strategien [97-99]. Daher ist es sowohl von klinischem als auch grundlagenwissenschaftlichem Interesse, neue molekulare Netzwerke zu identifizieren, auf deren Grundlage effektivere oder individualisierte Therapiemethoden entwickelt werden können [99-101].

Ein Faktor, der auch verstärkt in den Fokus der GBM-Forschung gerückt ist, ist das bereits genannte Proteoglykan NG2. Eine erhöhte NG2-Expression ist im GBM neben einer erhöhten Strahlen- und Chemoresistenz mit einer verstärkten invasiven Zellproliferation durch die Interaktion mit extrazellulären Proteinen, wie Laminin- α 2 und Kollagen VI, assoziiert [32, 102-104]. Interessanterweise zeigten vorläufige Daten unserer Arbeitsgruppe, dass die miR-29b posttranskriptionell die NG2-Expression reguliert. Dementsprechend liegt die Vermutung nahe, dass miR-29 eine wesentliche Rolle bei der NG2-vermittelten Proliferation, Invasion und Migration von GBM-Zellen spielt.

3.5 MiRNAs

MiRNAs sind 18 bis 24 Nukleotide lange, einzelsträngige, nicht-kodierende RNA-Moleküle. Sie gelten als wirksame Master-Regulatoren, welche posttranskriptionell die eukaryotische Proteinexpression beeinflussen [105-107]. Die Biogenese der miRNAs beginnt mit der Transkription der DNA-Sequenzen zur primären miRNA (pri-miRNAs) [108, 109]. Noch im Zellkern prozessiert ein Mikroprozessor-Komplex, bestehend aus der RNA-Endonuklease Drosha und dem dsRNA-Bindeprotein DGCR8, das Primärtranskript in eine *precursor* miRNA

(pre-miRNA) [110, 111]. Nach einem aktiven Transport in das Zytosol wird die pre-miRNA in einem finalen Schritt durch die RNA-Endonuklease Dicer zur reifen doppelsträngigen miRNA prozessiert [112, 113]. Ihre regulatorische Aktivität erlangen die miRNAs durch die Bildung eines RNA-*induced silencing complex* (RISC) bestehend aus einem 3'- oder 5'-miRNA-Strang und einem Argonautenprotein [105, 107, 114]. In den meisten Fällen bindet dieser miRNA-RISC-Komplex an komplementäre Bereiche der 3'-*untranslated region* (UTR) von spezifischen mRNA-Zielmolekülen und initiiert die Unterdrückung der Translation, die Deadenylierung und letztlich den vollständigen Abbau der mRNA [115-117]. Neben der 3'-UTR interagieren miRNAs auch mit der 5'-UTR der codierenden Sequenz einer mRNA sowie auf transkriptioneller Ebene mit Promotoren. Dabei wird das Zielmolekül durch die konservierte, 8 Nukleotide lange Seed-Sequenz der jeweiligen miRNA bestimmt [106, 109, 118-120].

Insgesamt können 60 % der humanen mRNAs spezifisch durch miRNAs beeinflusst werden, wobei eine einzige miRNA die Expression von über tausend Genen posttranskriptionell reguliert und so zelluläre Prozesse der Proliferation sowie Zelldifferenzierung bis hin zur Apoptose beeinflusst [121-123]. Folglich ist es nicht verwunderlich, dass eine Dysregulation von miRNAs große Auswirkungen auf physiologische Prozesse hat [121, 124, 125]. Eine Veränderung von miRNA-Expressionsprofilen wird bei pathologischen Prozessen, wie Diabetes, Parkinson, viralen Infektionen und Tumorwachstum, beobachtet [121, 126-128]. Zudem dienen extrazelluläre, zirkulierende miRNAs dem Kommunikationsaustausch zwischen einzelnen Zelltypen und haben damit ein hohes Potential, als prognostischer und diagnostischer Biomarker eingesetzt zu werden [121, 128-130]. Mehrere Studien zeigten bereits, dass veränderte miRNA-Expressionsprofile während physiologischer und pathologischer Bedingungen in Blut, Urin, Synovialflüssigkeit oder Cerebrospinalflüssigkeit detektiert werden können [128, 130-132].

Zu den bekannteren miRNAs, deren Dysregulation mit Pathologien wie Osteoarthritis, Diabetes und Multiple Sklerose assoziiert werden, zählt die miR-29 Familie, bestehend aus miR-29a, miR-29b-1, miR-29b-2 und miR-29c [107, 133, 134]. Die Gencluster der miR-29-Familie sind auf Chromosom 7p32.3 bzw. 1q32.2 lokalisiert und werden in die zwei Primärtranskripte pri-miR-29a/b-1 bzw. pri-miR-29b-2/c transkribiert [133, 135]. Obwohl sich die Sequenzen der pre-miR-29b-1 und -2 unterscheiden, sind nach der finalen Prozessierung die beiden reifen miRNAs identisch und besitzen die gleiche Seed-Sequenz wie miR-29a und miR-29c [107, 136]. Die drei Familienmitglieder besitzen zwar eine identische Seed-Sequenz, jedoch variieren ihre regulatorischen Möglichkeiten durch sequenzspezifische Merkmale. So ermöglicht das Hexanukleotid-Kernlokalisierungssignal der miR-29b die Genregulation direkt im Nukleus [137, 138]. Zudem besitzen miR-29b und miR-29c eine Tri-Uracil-Sequenz, welche für einen rapiden Abbau und Turnover sorgt, wogegen der Cytosin-Rest der miR-29a deren Struktur stabilisiert [139].

Obwohl miRNAs zahlreiche Signalwege regulieren, nehmen miRNA-Familien oft starken Einfluss auf einen Phänotyp, indem sie simultan eine große Anzahl funktionell ähnlicher Gene regulieren [133, 140]. Der miR-29-Familie wird eine starke anti-fibrotische Aktivität zugeschrieben, da sie durch die Regulation von Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM), wie Elastin, Kollagen, Laminin- γ 1, Matrix-Metalloproteinase (MMP)3 und Integrin β 1, eine wichtige Rolle in der Formation der EZM sowie der *epithelial-mesenchymal transition* (EMT) spielen [133, 141-147]. Die essenzielle Bedeutung der miR-29-Familie zeigten murine *in vivo* Studien, bei denen ein vollständiger Knockout der miR-29-Familie zu massiven Entwicklungsdefekten führte [122, 148-150]. Die Isoformen der miR-29b-Familie übernehmen dabei unterschiedliche funktionelle Aufgaben [122, 151-154].

Eine ektopische Expression der miR-29-Familie wurde bereits in mehreren Tumoren detektiert, wobei sie meistens eine Funktion als Tumorsuppressor ausübt [107, 155]. Besonders die miR-29b als fundamentaler Regulator der EMT beeinflusst die Tumormetastasierung und Chemoresistenz unter anderem bei Brustkrebs, Prostatakrebs und SCCHN [155-158]. Auch im GBM ist die Expression der miR-29b reprimiert und eine Überexpression resultiert durch einen miR-29b-vermittelten mRNA-Abbau verschiedener Zielmoleküle in anti-kanzerogene Effekte [159-162]. Neben den bereits bekannten Zielmolekülen wurde im Rahmen einer vorangegangenen Masterarbeit mittels *in silico* Analysen eine Bindestelle der miR-29b im 3'-UTR der mRNA des Proteoglykans NG2 detektiert [163]. Zusätzlich wurde zwar auf mRNA-Ebene nach miR-29b-Überexpression eine Reduktion des NG2-Gehalts in GBM-Zelllinien nachgewiesen, jedoch wurde die direkte Interaktion der miR-29b mit der NG2-3'UTR nicht analysiert [163]. Aufgrund dieser Vorergebnisse und der funktionellen Rolle von NG2 und der miR-29b während der GBM-Tumorprogression könnte die weiterführende Analyse der Regulation von NG2 durch die miR-29b neue Einblicke in das komplexe Netzwerk des heterogenen GBM geben.

4 Ziele der Arbeit

NG2-positive Tumore werden mit einem angiogenen, proliferativen und invasiven Phänotyp assoziiert. Entsprechend wird aktuell daran gearbeitet, neue Therapiestrategien zu etablieren, welche die NG2-Expression in Tumoren reduzieren. Die anti-angiogenen und anti-proliferativen Effekte infolge einer CK2-vermittelten Inhibition der NG2-Expression wurden bereits in Perizyten und in GBM-Zellen untersucht und bestätigt.

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit sollte daher der Einfluss der CK2-Inhibition auf die NG2-Expression, die Proliferation und die Migration von JA-Zellen analysiert werden. Dabei wurden unter Verwendung der zwei CK2-Inhibitoren CX-4945 und SGC-CK2-1 folgende Fragestellungen untersucht:

1. Wird die CK2 und NG2 in primärem JA-Gewebe und JA-Zellen exprimiert?
2. Beeinflusst die CK2-Aktivität die NG2-Expression in JA-Zellen?
3. Reduziert eine CK2-Inhibition die Proliferations- und Migrationsfähigkeit von JA-Zellen?

Im zweiten Studienabschnitt sollte die Funktion der miR-29b in GBM-Zellen untersucht werden. Ausgehend von Daten einer vorangegangenen Masterarbeit lag der Fokus auf einer miR-29b-vermittelten Regulation der NG2-Expression. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit folgenden Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Reguliert miR-29b posttranskriptionell die NG2-Expression in GBM-Zellen?
2. Reguliert miR-29b transkriptionell die NG2-Expression in GBM-Zellen?
3. Beeinflusst miR-29b die Expression eines regulatorischen NG2-Netzwerkes?
4. Reduziert miR-29b die Proliferations- und Migrationsfähigkeit von GBM-Zellen?
5. Wie wird die Expression der miR-29b in GBM-Zellen reguliert?

5 Material und Methoden

5.1 Zellbiologische Methoden

5.1.1 Zellkultur

Das in dieser Arbeit verwendete Primärgewebe (JA1-JA5) und die Primärzellen (JA1-JA4) aus humanen JAs wurden freundlicherweise von der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes (Prof. Dr. Bernhard Schick und Dr. Silke Wemmert) zur Verfügung gestellt. Die Verwendung der humanen Proben wurde von der Ethikkommission der Universität des Saarlandes genehmigt (#218/10) und die schriftliche Einwilligungserklärung von allen Patienten eingeholt. Die Primärzellen JA1-JA4 wurden aus je 1 cm³ entsprechendem Primärgewebe generiert. Dafür wurde das Gewebe direkt nach der Exstirpation mit 1 mg/ml Protease Typ XIV (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in *dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM; PromoCell, Heidelberg, Deutschland) supplementiert mit 2,5 µg/ml Amphotericin B (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) über Nacht bei 4°C verdaut. Anschließend wurden die Primärzellen in DMEM/F-12 Glutamax supplementiert mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS; Thermo Fisher Scientific), 1 % Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep; Thermo Fisher Scientific), 1 % Natriumpyruvat (Thermo Fisher Scientific), 10 µg/ml Gentamycin (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) und 2,5 µg/ml Amphotericin B kultiviert. Die humane embryonale Nieren-Zelllinie HEK293 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA) sowie die humane GBM-Zelllinie U87MG (U87; ATCC) wurden in DMEM kultiviert. Die humane GBM-Zelllinie A1207 (Symbiotec GmbH, Saarbrücken, Deutschland) wurde in *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI; PromoCell) Medium kultiviert und die GBM-Zelllinie M059K (ATCC) in DMEM F-12 (PromoCell). Die verwendeten Medien wurden mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep supplementiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxid und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit (CO₂-Inkubator CB56, Binder, Tuttlingen, Deutschland). Beim Erreichen einer Konfluenz von 70 % wurden die Zellen im Verhältnis von 1:3 mit Trypsin (PAN-Biotech GmbH) passagiert.

5.1.2 Immunfluoreszenz und Immunhistochemie

Für immunhistochemische Färbungen wurden JA-Gewebeproben direkt nach Entnahme in 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 24 h bei 4 °C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Proben in einer Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Von den Gewebeproben wurden 3 µm dünne Schnitte hergestellt und diese für 1 h bei 97 °C in Citrat-Puffer permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 3 % Ziegen-Serum für 30 min bei Raumtemperatur (RT) blockiert. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C mit den Primärantikörpern anti-CD31 (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland), anti-Vimentin (Agilent Technologies), anti-NG2 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland), anti-

CK2 α (Santa Cruz Biotechnology) oder anti-CK2 β (Santa Cruz Biotechnology) inkubiert. Das DAKO Fast Red Kit (K5005; Agilent, Frankfurt, Deutschland) wurde nach Herstellerangaben verwendet. Zuletzt wurden die Zellkerne mit Mayers Hämatoxylin (Merck, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt.

Für Immunfluoreszenz-Färbungen wurden JA-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und nach 48 h Kultivierung mit 4 % PFA für 15 min bei RT fixiert. Nach drei Waschschritten mit 1x *phosphat-buffered saline* (PBS) wurden die JA-Zellen mit Permeabilisierungslösung (0,2 % Triton; 2 % BSA in 1x PBS) inkubiert. Die Zellen wurden mit 1 % *bovine serum albumin* (BSA)/1x PBS für 15 min gewaschen und mit den Primärantikörpern anti-NG2 (1:50) und anti-Vimentin (1:50; Agilent Technologies) für 1 h inkubiert. Es folgten drei Waschschrritte mit 1x PBS für 10 min. Anschließend wurden die Zellen mit einem entsprechenden Fluoreszenz-konjugierten Sekundärantikörper (Agilent Technologies) für 1 h inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit 1x PBS gewaschen, die Zellkerne mit Hoechst 33342 (2 $\mu\text{g/ml}$) für 15 min angefärbt und erneut gewaschen. Die immunhistochemischen und Immunfluoreszenz-Färbungen wurden mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops in 200x Vergrößerung visualisiert (BX61; Olympus, Hamburg, Deutschland) und die positiv gefärbten Zellen mittels ImageJ Software (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA) quantifiziert.

5.1.3 CK2-Inhibitoren: CX-4945 und SGC-CK2-1

Für die Untersuchungen der *in vitro* Effekte der CK2-Inhibitoren CX-4945 (ActivateScientific, Prien, Deutschland) und SGC-CK2-1 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurden verschiedene Analysen durchgeführt. Die JA1-JA4 Primärzellen wurden je nach Experiment mit einer definierten Zellzahl ausgesät und am Folgetag für 24 h oder 48 h mit Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich), CX-4945 (10 μM) und SGC-CK2-1 (5 μM) behandelt. Im Anschluss wurden unterschiedliche Versuche durchgeführt.

5.1.4 Transiente Transfektion

Das Einbringen von DNA- und RNA-Molekülen in Zellen erfolgte unter Verwendung von kationischer lipidbasierten Transfektionsreagenzien. Die transiente Transfektion von miRNAs wurde mithilfe des HiPerfect Transfektions-Reagenz (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Hierfür wurden 24 h vor Transfektion 2×10^4 A1207-Zellen bzw. $2,5 \times 10^4$ U87-Zellen im 24-Well Format ausgesät. Zur Überexpression der miR-29b wurden die Zellen für 48 h mit 50 nM 5-FAM markierter miR-29b-3p-Mimic (miR-29b-Mimic; YM00473486-ADB; Qiagen) transfiziert. Eine Inhibition der endogenen miR-29b erfolgte über die Transfektion der Zellen mit 100 nM miR-29b-3p-Inhibitor (miR-29b-Inh; YI04101843-ADA; Qiagen). Als Kontrollen dienten mit Mimic-Negativkontrolle (ctrl; YM00479902-ADB; Qiagen) oder Inhibitor-Negativkontrolle (ctrl; YI00199006-ADA; Qiagen) transfizierte Zellen. Die

transiente Transfektion von Expressions- und Reporter-genvektoren erfolgte mittels Lipofectamin 3000 (Thermo Fisher Scientific). Für die Überexpression der *long non-coding* (lnc)RNA H19 und c-Myc wurden im 24-Well Format 4×10^3 A1207-Zellen und $4,5 \times 10^3$ U87-Zellen ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit 250 ng pcDNA, pcDNA_H19 [164] oder pcDNA_c-Myc [165] (addgene, Watertown, MA, USA) nach Herstellerprotokoll transfiziert. Als Kontrolle diente der Leervektor pcDNA. Die Reporter-genassays mit der 3'-UTR von NG2 und PDGFR α und der Promotorregion von NG2 erfolgten in HEK293-Zellen. Diese wurden bis zu einer Konfluenz von 70 % kultiviert (24-Well-Format). Anschließend wurden 250 ng pGL4, pGL4_NG2-3'-UTR-WT, pGL4_NG2-3'-UTR-MUT, pGL4_PDGFRA-3'-UTR-WT oder pGL4_PDGFRA-3'-UTR-MUT mit 50 nM ctrl oder miR-29b-Mimic cotransfiziert. Für die NG2-Promotoranalysen wurden 250 ng pGL4_NG2-Promotor [38] und pEF_Sp1 [166] mit 50 nM miR-29b-Mimic oder ctrl mithilfe von Lipofectamin cotransfiziert. Nach 48 h erfolgte in Abhängigkeit der weiterführenden Experimente die Zellernte.

5.1.5 Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrischen Analysen von Oberflächenmolekülen wurden Fluorochrom-konjugierte Antikörper verwendet. Hierfür wurden die Zellen aus ihrem Kulturgefäß mit enzymfreien Zelldissoziationspuffer (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland) gelöst, zentrifugiert (5 min, 600 xg, RT), mit 1x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet gelöst und die Zellen mit Phycoerythrin (PE)-konjugierten Antikörpern (1:20; *Tabelle 1*; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) versetzt und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Der PE-konjugierte anti-Maus IgG2 α , κ Antikörper (1:20; BD Biosciences) diente als Isotypkontrolle. Nach der Inkubation folgte ein Waschschriff mit 1x PBS und eine Zentrifugation für 5 min bei 600 xg und RT. Die Messung der Zellsuspension erfolgte an einem BD FACSLyric™ Durchflusszytometer (BD Biosciences) und die Auswertung mithilfe der BD FACSuite™ Software (BD Biosciences).

Tabelle 1: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie.

Antikörper	Isotyp	Artikelnummer
PE Mouse Anti-Human Chondroitin Sulfate (NG2)	PE mIgG2 α , κ	562415
PE Mouse Anti-Human CD140a (PDGFR α)	PE mIgG2 α , κ	556002
PE Mouse Anti-Human CD140b (PDGFR β)	PE mIgG2 α , κ	558821
PE Mouse Anti-Human CD29 (ITGB1)	PE mIgG2 α , κ	556049

5.1.6 Scratch-Assay

Für die Analyse der Zellmigration wurden *scratch*-Assays durchgeführt. Dafür wurde mit einer Pipettenspitze (20-200 µl) ein Spalt durch einen konfluenten Zellrasen (24-Well Platte) gezogen. Die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen und anschließend wurde das Zuwachsen der Spaltfläche über einen Zeitraum von 24 h (0 h, 16 h, 24 h) lichtmikroskopisch (Leica DM IL Mikroskop mit DFC 450C Kamera; Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) erfasst. Die Auswertung erfolgte durch die Vermessung der zellfreien Fläche zu den einzelnen Zeitpunkten mithilfe der Leica Application Suite Version 4.8 Software (Leica Microsystems).

5.1.7 Water-soluble tetrazolium (WST)-1-Assay

Die Zellviabilität wurde mit einem WST-1-Assay analysiert. Dabei dient die Messung der metabolischen Verstoffwechslung von Tetrazoliumsalz zu Formazan durch die Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase als Indikator für die Zellviabilität. Für das Assay wurden pro Vertiefung einer 96-Well Platte 2000 JA-, 3000 A1207- und 4000 U87-Zellen ausgesät. Nach den jeweiligen Inkubationszeitpunkten wurde 10 µl WST-1-Reagenz (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) pro Well zu den Zellen gegeben und für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm im Spark®-Mikroplatten-Reader (Tecan, Crailsheim, Deutschland) detektiert.

5.1.8 Transwell-Assay

Die Zellmigration wurde in Transwell-Assays analysiert. Dafür wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in entsprechendem Medium (200 µl) mit 0,5 % FCS aufgenommen und in einen Polycarbonat-Membraneinsatz einer Transwell-Platte (Porengröße 8 µm; Corning, Kaiserslautern, Deutschland) ausgesät. Für den chemotaktischen Migrationsreiz wurde in das Well 750 µl des entsprechenden Mediums mit 5 % FCS gegeben. Nach 5 h wurden nicht migrierte Zellen entfernt und migrierte Zellen in der Polycarbonat-Membran mittels Haemacolor-Schnellfärbung (MarMed GmbH, Cölbe, Deutschland) angefärbt. Die Färbungen wurden lichtmikroskopisch bei einer 20-fachen Vergrößerung visualisiert (BZ-8000K Mikroskop; Keyence, Osaka, Japan) und die Anzahl an migrierten Zellen in 20 Hauptgesichtsfeldern/ Polycarbonat-Membran bestimmt.

5.1.9 Spheroid sprouting-Assay

Für die Generierung von Sphäroiden wurden in einer mit 1 %iger Agarose beschichteten 96-Well-Platte pro Vertiefung 500 A1207- und JA-Zellen ausgesät. Nach einer Kultivierungsdauer von 24 h wurden 40 Sphäroide gesammelt und in einer Kollagen-Lösung aufgenommen [167]. Die Sphäroid-Kollagen-Suspension wurde in eine 24-Well Platte überführt und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Sphäroide mit dem entsprechenden Medium

überschichtet. Nach weiteren 48 h wurde das Aussprossen der Sphäroide lichtmikroskopisch dokumentiert (Leica DM IL Mikroskop mit DFC 450C Kamera; Leica Microsystems) und die Sprossungsfläche mittels ImageJ Software (NIH) vermessen.

5.1.10 Bromdesoxyuridin (BrdU)-Assay

Die Analyse der Zellproliferation erfolgte mittels eines BrdU-Assays. Dabei wird das Thymidin-Analogon BrdU von proliferierenden Zellen während der Zellteilung in die DNA eingebaut. Hierfür wurden die JA-Zellen mit 10 µM BrdU (Roche Diagnostics) für 16 h behandelt. Danach wurden die Zellen geerntet und mit 70 % Ethanol für 30 min auf Eis fixiert sowie permeabilisiert. Die Zellsuspension wurde bei 600 xg für 5 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die DNA mit 2 M HCl/0,5 % Triton X-100 für 30 min bei RT denaturiert. Die Neutralisierung der DNA-Suspension erfolgte mit drei Waschschritten (1x PBS/0,05 % Tween 20). Anschließend wurden die Zellen mit PE-konjugiertem BrdU-Antikörper (1:20; Thermo Fisher Scientific) für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Als Isotypkontrolle diente ein PE-konjugierter anti-Maus IgG1k Antikörper (1:20; Thermo Fisher Scientific). Nach der Inkubation folgte ein Waschschriff mit 1x PBS und die durchflusszytometrische Analyse der BrdU-markierten viablen Zellen (Kapitel 5.1.5).

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Konstruktion von Reportergenvektoren

Alle Materialien, Geräte und Arbeitsplätze, die für das Klonieren und Arbeiten mit Bakterien benötigt wurden, stellten freundlicherweise Prof. Dr. Götz und Prof. Dr. Montenarh (Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes) zur Verfügung. *In silico* Analysen der TargetScan7.3 Datenbank zeigten, dass die humane NG2-3'-UTR sowie die humane PDGFRA 3'-UTR eine potenzielle Bindestelle der miR-29b besitzen [168]. Für die Überprüfung der direkten Interaktion der miR-29b mit den untersuchten 3'-UTRs wurden diese in den *Xba*I-linearisierten Luciferasereportervektor pGL4.10[*luc2*] (pGL4) kloniert (Abbildung 4). Für die Mutation der miR-29b Bindestelle in der NG2- und PDGFRA-3'-UTR wurden über *overlap-extension*-Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) sechs der sieben Basen der Seed-Sequenz verändert. Die mutierten NG2- und PDGFRA-3'-UTR wurden ebenfalls in den *Xba*I-linearisierten Luciferasereportervektor kloniert. Die Konstruktion der Reportervektoren erfolgte in *Escherichia coli* (*E. coli*) XL1 Blue. Die Selektion positiver Transformanden erfolgte über die Vektor-vermittelte Ampicillin-Resistenz.

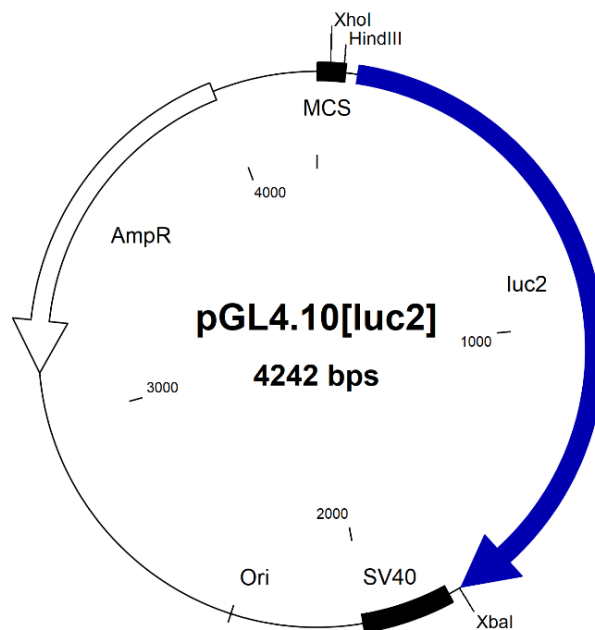


Abbildung 4: Schematische Vektorkarte von pGL4.10[luc2]. Die *multiple cloning site* (MCS; schwarz) mit den Erkennungssequenzen für die *XhoI* und *HindIII* Restriktionsenzyme ist vor dem Luciferase-Reportergen (*luc2*; blau) lokalisiert. Die *XbaI* Restriktionsschnittstelle wurde für die Klonierung der 3'-UTR von NG2 und PDGFRA verwendet. Die eukaryotische Transkription des Plasmids wird durch die SV40 Poly(A)-Region (SV40; schwarz) terminiert. Die prokaryotische Expression wird durch den Replikationsursprung (Ori) reguliert. Anhand der β -Lactamase (AmpR; weiß)-vermittelten Ampicillin-Resistenz wurden transformierte Bakterien selektiert.

5.2.2 PCR

Die PCR wurde für die Amplifikation der humanen NG2-3'-UTR sowie der humanen PDGFRA-3'-UTR verwendet. Die Amplifikation der Sequenzen erfolgte über spezifische Primer (*Tabelle 2*; Thermo Fisher Scientific) unter Verwendung der Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific) und humaner A1207 cDNA als Template. Die PCR wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt und die Elongationszeit an die jeweilige Länge (Basenpaar (bp)) des zu amplifizierenden DNA-Produkts angepasst. Die Annealing-Temperaturen der Primer (Merck, Darmstadt, Deutschland) sind in *Tabelle 2* gelistet. Die verwendeten Primer wurden mit der Software Clone Manager 9 (Sci Ed Software LLC, Westminster, CO, USA) generiert. Die PCR-Reaktionen wurden im CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland) durchgeführt.

Tabelle 2: Verwendete PCR-Primer-Sequenzen mit Amplikatlänge und Annealing-Temperatur.

Name	Sequenz (5'→3' Orientierung)	Länge Amplikat (bp)	Annealing-Temperatur (°C)
NG2-3'-UTR-WT-fw	GCGGCAAGATCGCCGTGTAATAATTAG	471	57
NG2-3'-UTR-WT-rv	AGCGCCTCCAGTCTAGAAGGCATAAG CCGCCCGACTCTAGGACAAGGGCCCA GTGCATAGTTAAG		

Material und Methoden

NG2-3'-UTR-MUT-fw	GGAAGCTATTTAACACATCGAGGAGCTA GCCAGGACTG	343	55
NG2-3'-UTR-MUT-rv	CAGTCCTGGCTAGCTCCTCGATGTGTTA AATAGCTTCC	166	55
PDGFRA-3'-UTR-WT-fw	GGCGGCAAGATCGCCGTGTAATAATTA AGCTTTGGCGACCCCAATA	1825	52
PDGFRA-3'-UTR-WT-rv	CGGCCGCCCGACTCTAGCATGAACAG GGGCATTCGTA		
PDGFRA-3'-UTR-MUT-fw	GTACAGCCTTATTTTGTAGCTGCTTGC ATTTTGATATTG	685	50
PDGFRA-3'-UTR-MUT-rv	CAATATCAAATGCAAGCAGCTGACAAA ATAAGGCTGTAC	1180	53

Für die Substitution der miR-29b Bindestelle in der 3'-UTR der NG2- und PDGFRA-mRNA wurden überlappende PCR-Primer mit veränderter miR-29b Seed-Sequenz generiert (Tabelle 2; rot markiert). Mittels PCR wurden zwei NG2-3'-UTR-MUT bzw. PDGFRA-3'-UTR-MUT PCR-Fragmente generiert, die anschließend über eine mehrschrittige *overlap-extension-PCR* zum Fragment NG2-3'-UTR-MUT bzw. PDGFRA-3'-UTR-MUT amplifiziert wurden. Im ersten Schritt der *Overlap-Extension-PCR* annealen die homologen Bereiche der zwei NG2-3'-UTR-MUT bzw. PDGFRA-3'-UTR-MUT Fragmente zu einem PCR-Produkt (Tabelle 3 und 4).

Tabelle 3: Komponenten der ersten *overlap-extension-PCR*.

Komponenten	Volumen (25 µl)
5x Phusion™ HF Puffer	5x
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs; 100 mM)	200 µM
NG2-3'-UTR-MUT 1	100 ng/1 Kilobasen (kb)
NG2-3'-UTR-MUT 2	100 ng/1 kb
Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase	0,02 U/µl

Tabelle 4: Zyklusbedingungen der ersten *overlap-extension-PCR*.

Schritte	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95 °C	30 Sekunden (s)
2. Denaturierung	95 °C	15 s
3. Annealing	72 °C (-0,5 °C/Zyklus)	30 s/kb
9x-Wiederholung der Schritte 2-3		
12. Denaturierung	95 °C	15 s
13. Annealing	67,5 °C (-0,5 °C/Zyklus)	15 s
14. Elongation	72 °C	30 s/kb
5x-Wiederholung der Schritte 2-4		
17. Finale Elongation	72 °C	1 Minuten (min)

Im zweiten Schritt der *overlap-extension-PCR* wurde das generierte NG2-3'-UTR-MUT- bzw. PDGFRA-3'-UTR-MUT-Fragment durch die Zugabe der flankierenden Primer (NG2-3'-UTR-WT bzw. PDGFRA-3'-UTR-WT Primer; *Tabelle 2*) amplifiziert (*Tabelle 5 und 6*).

Tabelle 5: Komponenten der zweiten *overlap-extension-PCR*.

Komponenten	Volumen (25 µl)
5x Phusion™ HF Puffer	5x
dNTPs (10 mM)	200 µM
Schritt 1 PCR-Reaktion	4 µl
NG2_3UTR_MUT-fw	2 µM
NG2_3UTR_MUT-rv	2 µM
Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase	0,04 U/µl

Tabelle 6: Zyklusbedingungen der zweiten *Overlap-Extension-PCR*.

Schritte	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95 °C	30 s
2. Denaturierung	95 °C	15 s
3. Annealing	67 °C (-0,5 °C/Zyklus)	15 s
4. Elongation	72 °C	30 s/kb
17x-Wiederholung der Schritte 2-4		
21. Denaturierung	95 °C	15 s
22. Annealing	59 °C	15 s
23. Elongation	72 °C	30 s/kb
23x-Wiederholung der Schritte 2-4		
46. Finale Elongation	72 °C	2 min

Die erfolgreiche Insertion der DNA-Sequenzen in den Vektor wurde mittels Kolonie-PCR nachgewiesen. Abweichend zum Herstellerprotokoll der Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase wurde das PCR-Reaktionsvolumen auf 10 µl reduziert. Als DNA-Template dienten einzelne *E. coli* XL1 Transformanden-Kolonien, welche mit einer Pipettenspitze gepickt, auf einer LB_{Tet, Amp}-Platte (Tetrazyklin 12,5 µg/ml, Ampicillin 50 µg/ml) ausgestrichen und anschließend in den PCR-Ansatz gemischt wurden. Die initiale Denaturierungsphase wurde auf 1 min erhöht und die Amplifikation erfolgte unter Verwendung von pGL4-Vektorprimern bei 58 °C (pGL4-fw: 5'-CCAGTGCAAGTGCAGGTGCCAGAAC-3' und pGL4-rv: 5'-

GAATGGCGCTGGGCCCTTCTTAATG-3'). Alle weiteren Schritte erfolgten nach Herstellerprotokoll.

5.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Aufreinigung und Überprüfung von PCR- und Restriktionsprodukten wurden diese mit 6x DNA *gel loading dye* (Thermo Fisher Scientific) versetzt und über ein 1 %iges, Ethidiumbromid-haltiges (0,5 µg/ml) Agarosegel bei einer angelegten Spannung von 100 Volt (V) ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Als Referenz diente ein 1 kb DNA-Marker (Thermo Fisher Scientific). Die Visualisierung der DNA-Banden erfolgte mittels UV-Licht im Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) mit der Quantity One[®] 1D Analysis Software 4.6.5 (Bio-Rad Laboratories GmbH). Die DNA-Banden wurden manuell unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels des GeneJet[™] Gel Extraktion Kits (Thermo Fisher Scientific) aufgereinigt. Die Elution der DNA erfolgte mit H₂O und die DNA-Konzentration wurde mit dem DeNovix DS-11+ Mikrovolumen-Spektralphotometer (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) bestimmt.

5.2.4 Plasmid-Isolierung

Die Isolierung von Plasmiden erfolgte mit dem GeneJet[™] Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific) und NucleoBond[™] Midi Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerprotokoll. Die DNA wurde mit H₂O eluiert und die Konzentration wurde mit dem DeNovix DS-11+ Mikrovolumen-Spektralphotometer (Biozym Scientific GmbH) bestimmt.

5.2.5 Restriktion und Dephosphorylierung von Vektoren

Die Restriktion von pGL4 erfolgte mit dem Restriktionsenzym *Xba*I (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben. Um die Wahrscheinlichkeit einer Selbstligation nach der Restriktion zu minimieren, wurde der verdaute Vektor zusätzlich unter Verwendung der Antarctic Phosphatase (New England BioLabs GmbH (NEB), Frankfurt am Main, Deutschland) nach Herstellerprotokoll dephosphoryliert.

5.2.6 Gibson assembly

Das *gibson assembly* ist eine Exonuklease-basierende Klonierungsmethode, die zur Generierung der Reportervektoren verwendet wurde. Unter isothermen Bedingungen ermöglicht die enzymatische Aktivität einer Exonuklease, DNA-Polymerase und DNA-Ligase das nahtlose Zusammenfügen homologer DNA-Fragmente. Sie wurde genutzt, um die NG2- und PDGFRA-3'-UTR-Fragmente in den Reportervektor pGL4 zu klonieren. In *Tabelle 7* ist die

Zusammensetzung des isothermen-Reaktionspuffers und des *gibson assemblys* aufgelistet. Das *gibson assembly* wurde für 60 min bei 50 °C inkubiert und direkt für die Hitzeschock-Transformation von *E. coli* XL1 verwendet oder bei -20 °C gelagert.

Tabelle 7: Zusammensetzung 5x isothermer-Reaktionspuffer und *gibson assembly*.

5x isothermer-Reaktionspuffer (IRB):		<i>Gibson assembly</i> (20 µl):	
500 nM	Tris-HCl 2 M pH 7,5	1x	5x IRB
50 mM	MgCl ₂ 2 M	4 U/ml	T5 Exonuklease 10 U/µl (NEB)
50 mM	DTT 1 M	4 U/µl	Taq DNA Ligase 40 U/µl (NEB)
50 mM	NAD ⁺ 50 mM (NEB)	25 U/ml	Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase 2 U/µl (Thermo Fisher Scientific)
10 mM	dNTPs 10 mM (NEB)	50-150 ng	DNA (Vektor-Insert-Verhältnis: 1:3)
25 %	PEG-8000		

5.2.7 Transformation

Für das Einbringen der verwendeten Vektoren in kompetente *E. coli* XL1 Blue Bakterien wurde die Hitzeschock-Methode gewählt. Nach DNA-Zugabe wurden die *E. coli* XL1 Blue Bakterien 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock für 1 min bei 42 °C und eine zweiminütige Inkubation auf Eis. Nach der Zugabe von 700 µl LB-Medium wurden die Bakterien für 1 h bei 37 °C und 600 xg inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Bakterienkultur auf LB_{Tet, Amp}-Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Detektion von positiven Transformanden mittels Kolonie-PCR (Kapitel 5.2.2).

5.2.8 Nachweis der erfolgreichen Klonierung

Die Integration der Fragmente in den pGL4 Reportervektor wurde zunächst durch einen Restriktionsverdau mit nachfolgender gelelektrophoretischer Auftrennung überprüft und anschließend mittels Sequenzierung verifiziert (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland).

5.2.9 Ribonukleinsäure (RNA)-Extraktion

Für den Aufschluss der gesamten RNA aus Gewebefragmenten (50 mg) wurde diese zunächst in 700 µl QIAzol™ Lysis Reagent (Qiagen, Hilden, Deutschland) mithilfe eines Homogenisators (Micra MiniBatch D-1; MICCRA GmbH, Heitersheim, Deutschland) aufgeschlossen. Die Isolation der gesamten RNA aus Zellen erfolgte durch die Resuspension des Zellpellets in 700 µl QIAzol™ Lysis Reagent (Qiagen). Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 12000 xg und 4 °C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Anschließend wurde Chloroform hinzugegeben, invertiert und für 15 min bei 12000 xg und 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der Fällung der RNA und Zugabe von Isopropanol folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 12000 xg und 4 °C. Das RNA-Pellet wurde mit 75 % Ethanol gewaschen und für 5 min bei 7500 xg und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in RNase-freiem H₂O resuspendiert. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde anhand des DeNovix DS-11+ Mikrovolumen-Spektralphotometer (Biozym Scientific GmbH) bestimmt. Die RNA wurde im Anschluss direkt für die reverse Transkription weiterverwendet oder bei -80°C gelagert.

5.2.10 Reverse Transkription von Gesamt-RNA und miRNA

Die isolierte RNA wurde für quantitative Analysen mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Für die reverse Transkription von 1 µg RNA wurde der HighScriber™ Reverse Transcriptase Mix (HighQu, Kraichtal, Deutschland) bzw. das miScript II RT Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Die Konzentration und Reinheit der einzelsträngigen cDNA wurde anhand des De Novix DS-11+ Mikrovolumen-Spektralphotometers (Biozym Scientific GmbH) bestimmt. Die cDNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

5.2.11 Quantitative (q)PCR

Die qPCR ermöglicht durch die Verwendung eines Fluoreszenz-Farbstoffes die Detektion einer kontinuierlich entstehenden Amplifikatmenge. Die qPCR der gesamten mRNA wurden mittels des ORA™ SEE qPCR Green ROX L Mix (HighQu, Kraichtal, Deutschland) nach Herstellerangaben mit je 500 nM Primer (*Tabelle 8*; hergestellt von Merck) und 100 ng cDNA durchgeführt. Für die Analyse von miRNA-Expressionen wurde das miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll verwendet. Die Datenerhebung erfolgte am CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories) und mit der CFX Manager™ Software (Bio-Rad Laboratories). Die quantitativen Auswertungen von mRNA- bzw. miRNA-Expressionen erfolgten nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode. Als Referenzgen diente hierbei die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bzw. die *small nuclear ribonucleic acid* (snRNA) RNU6B. Das verwendete hsa-miR-29b-3p und RNU6B miScript Primer Assay wurden von Qiagen bezogen.

Tabelle 8: Verwendete qPCR-Primer-Sequenzen mit Amplifikatlänge.

Name	Sequenz (5'→3')	Länge Amplikat (bp)
c-Myc-fw	CCCACTGCTTACTGGCTTATC	93
c-Myc-rv	CAGCGAGCTCTAGCATTTAGG	
NG2-fw	GCAAGCCGATGTGGATTC	141

NG2-rv	ATGGCGGATGGTAGGATG	
GAPDH-fw	CCACCCATGGCAAATTCC	141
GAPDH-rv	ACTCCACGACGTACTIONAG	
H19-fw	TTCAAAGCCTCCACGACTCT	81
H19-rv	CTGAGACTCAAGGCCGTCTC	
ITGB1-fw	GGATTCTCCAGAAGGTGGTTTCG	143
ITGB1-rv	TGCCACCAAGTTTCCCATCTCC	
PTEN-fw	GTTTACCGGCAGCATCAAATG	194
PTEN-rv	CCACTTTAGTGACAGTTCC	
Sp1-fw	TGGCTGCCGCTCCCAACTTA	229
Sp1-rv	ATGATGTTGCCTCCACTTCCTCG	

5.3 Proteinchemische Methoden

5.3.1 Proteinextraktion

Für Western Blot-Analysen wurden die Zellen mit enzymfreiem Zelldissoziationspuffer (Thermo Fisher Scientific) von der Zellkulturschale gelöst, zentrifugiert (5 min, 600 xg, RT) und mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch die Zugabe von Lysepuffer (10 mM Tris 1M pH 7,5; 10 mM Natriumchlorid (NaCl 5 M; 0,1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 250 mM; 0,5 % Triton-X-100; 0,02 % NaN₃ supplementiert mit Protease-Phosphatase-Inhibitor Cocktail (1:100; Thermo Fisher Scientific) und Phenylmethylsufonylfluorid (PMSF; 1:100; 100 mM) 30 min auf Eis lysiert. Die Zelltrümmer wurden durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 21600 xg und 4 °C pelletiert und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford Methode mit dem Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories) im DeNovix DS-11+ Mikrovolumen-Spektralphotometer (Biozym Scientific GmbH) bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Proteinextrakte wurden bis zur semiquantitativen Analyse mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) bei -20 °C gelagert.

5.3.2 SDS-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine anhand ihres Molekulargewichts erfolgte mithilfe der SDS-PAGE. Die Proteinextrakte wurden mit 2x Laemmli-Puffer (Thermo Fisher Scientific) versetzt, 5 min bei 95 °C aufgeköcht und auf eine SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories) aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der denaturierten, negativ geladenen Proteine erfolgte bei einer Spannung von 100 V unter Verwendung eines 5x Laufpuffers (0,125 M Tris, 0,96 M Glycin, 0,05 % SDS). Dabei wurden Proteine mit einem Molekulargewicht 40-300 kDa auf einem 7,5 %igen Polyacrylamidtrenngel, Proteine von 30-180 kDa auf einem 10 %igen

Polyacrylamidtrenngel und Proteine kleiner als 30 kDa auf einem 12 %igen Polyacrylamidtrenngel und 5 % Polyacrylamidsammelgel aufgetrennt. Als Größenstandard diente der peqGOLD *pre-stained protein marker* IV (10-170 kDa; Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) bzw. der ProSieve QuadColor Protein Marker (4,6-300 kDa; Lonza, Köln, Deutschland).

Tris-Glycin Polyacrylamidgele:

7.5 % Trenngel:

4,85 ml H₂O
 2,5 ml 30 %-ige Acrylamid/Bis-Lösung
 2,5 ml 1 M Tris pH 8,8
 100 µl 10 % SDS
 50 µl 10 % APS
 15 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED)

10 % Trenngel:

4 ml H₂O
 3,3 ml 30 %-ige Acrylamid/Bis-Lösung
 2,5 ml 1 M Tris pH 8,8
 100 µl 10 % SDS
 100 µl 10 % APS
 15 µl TEMED

12 % Trenngel:

3,3 ml H₂O
 4 ml 30 %-ige Acrylamid/Bis-Lösung
 2,5 ml 1 M Tris pH 8,8
 100 µl 10 % SDS
 100 µl 10 % APS
 15 µl TEMED

5 % Sammelgel:

2,7 ml H₂O
 670 µl 30 %-ige Acrylamid/Bis-Lösung
 500 µl 1 M Tris pH 6,8
 40 µl 10 % SDS
 40 µl 10 % APS
 10 µl TEMED

5.3.3 Semi-dry-Blotting

Der Transfer der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Bio-Rad Laboratories) erfolgte über das *semi-dry*-Blot-Verfahren. Zunächst wurde die PVDF-Membran für 20 s in Methanol aktiviert. Die PVDF-Membran, die Filterpapiere (Macherey-Nagel) sowie das Polyacrylamidgel wurden in Bjerrum Schäfer-Nilson Puffer getränkt (96 mM Tris; 12 mM Glycin; 20 % Methanol) und der *semi-dry*-Blot nach Herstellerangaben (Bio-Rad Laboratories GmbH) aufgebaut. Im Anschluss des Transfers wurden unspezifische Antikörperbindungen durch eine einstündige Inkubation der PDVF-Membran mit 1x *tris-buffered saline* (200 mM TRIS; 1,37 M Natriumchlorid; pH 7,5 mit HCl) + 1 % Tween20 (TBS-T)/5 % BSA) blockiert. Anschließend wurde die PDVF-Membran mit Primärantikörpern (in 1x TBS-T/1 % BSA) inkubiert (*Tabelle 9*). Nach drei 10-minütigen Waschschritten mit 1x TBS-T wurde die PDVF-Membran mit dem jeweiligen Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörper für 1 Stunde (h) inkubiert. Es folgten erneut drei Waschschrritte mit 1x TBS-T für je 10 min. Die Visualisierung der gebundenen sekundären Antikörper erfolgte mit dem Clarity Western ECL Blotting Substrate

(Bio-Rad Laboratories GmbH) und dem Chemocam Imager® (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland). Die quantitative Auswertung wurde unter Verwendung der LabImage-Software (INTAS Science Imaging Instruments GmbH) durchgeführt.

Tabelle 9: Verwendete Antikörper für Western Blot-Analysen.

Antikörper	Anwendung	Hersteller
anti-pAKT (S129; ab133458)	1:100, 4 °C, über Nacht	Abcam, Cambridge, Großbritannien
anti-ERK1/2 (ab15799)	1:100, 4 °C, über Nacht	
anti-pERK1 (pT202/pY204) + Erk2 (pT185/pY187; ab50011)	1:100, 4 °C, über Nacht	
anti-PTEN (ab31392)	1:100, 4 °C, über Nacht	
anti-AKT (4685)	1:100, 4 °C, über Nacht	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland
anti-c-Myc (5605)	1:100, 4 °C, über Nacht	
anti-FAK (3285)	1:100, 4 °C, über Nacht	
anti-pAKT (S473; 4060)	1:100, 4 °C, über Nacht	
Anti-PARP (9542)	1:100, 4 °C, über Nacht	
anti-pFAK (Tyr397; 8556T)	1:100, 4 °C, über Nacht	
anti-CK2 α	1:1000, RT, 1 h	Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Homburg, Deutschland
anti-CK2 β (sc-46666)	1:500, RT, 1 h	Santa Cruz Biotechnology
anti-NG2 (sc166261)	1:100, 4 °C, über Nacht	
anti-Tubulin-HRP (66031)	1:1000, RT, 1 h	Proteintech, Planegg-Martinsried, Deutschland
anti-Maus IgG HRP (HAF008)	1:1000, RT, 1 h	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden, Deutschland
anti-Human IgG HRP (HAF007)	1:1000, RT, 1 h	

5.3.4 CK2-Phosphorylierungs-Assay

Die Messung der enzymatischen Aktivität der CK2 in JA-Gewebe erfolgte anhand eines Phosphorylierungs-Assays. Dabei wird die Inkorporationsrate von radioaktiv markiertem ATP ($[^{32}\text{P}]\gamma\text{ATP}$; Thermo Fisher Scientific) in CK2-spezifische Substrate mit der Sequenz RRRDDDSDDD detektiert. Zunächst wurde das Gewebe lysiert und anschließend die Proteinkonzentration bestimmt (Kapitel 5.3.1). In 20 μl Kinasepuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT) wurden 20 μg Proteinlysate aufgenommen und mit

30 µl CK2-Mix (25 mM Tris-HCl pH 8,5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,19 mM Substratpeptiden) und mit 10 µCi/500 µl [³²P]γATP gemischt. Der Mix wurde auf ein P81 Chromatographie-Papier (Sartorius, Göttingen, Deutschland) getropft, welches anschließend dreimal mit 85 mM H₃PO₄ und einmal mit Ethanol gewaschen wurde. Nach der Trocknung des Papiers wurde die Tscherenkow-Strahlung in einem Szintillationszähler (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) gemessen.

5.3.5 Luciferase-Reportergenanalyse

Für die Analyse der transkriptionellen und posttranskriptionellen Aktivität der regulatorischen Regionen von NG2 bzw. PDGFR α wurden Luciferase-Reportergenanalysen durchgeführt. Hierfür wurden HEK293-Zellen mit Reporterkonstrukten, Expressionsplasmiden und miR-29b Mimic transfiziert (Kapitel 5.1.4). Nach 48 h wurden die Zellen mit Lysepuffer (25 mM TRIS-Phosphat-Puffer pH 7,8; 2 mM DTT; 2 mM EDTA; 10 % Glycerin; 1 % Triton X-100) im Zellkulturgefäß lysiert, für 5 min bei 21600 xg zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet. Die Luciferase-Aktivität als Relative Lichteinheit (RLU) wurde nach Herstellerangaben mit dem Luciferase Assay System von Promega (Walldorf, Deutschland) und dem Multimode Mikroplatten-Reader Infinite[®] 200 Pro (Tecan) detektiert. Für die Auswertung wurden die RLU auf die Proteinkonzentration (Kapitel 5.3.1) normalisiert.

5.4 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Prism Software (Prism 10 Version 10.1.2; GraphPad Software, MA, Boston, USA). Zunächst wurden die erhobenen Daten auf Normalverteilung und gleichmäßige Varianz geprüft. Die Signifikanz zwischen zwei Gruppen (Normalverteilung) wurde mittels eines ungepaarten Student's t-Test geprüft. Unterschiede zwischen mehr als zwei Gruppen wurden durch eine einseitige Varianzanalyse (ANOVA) geprüft, gefolgt von einem *Tukey post-hoc* Test zur Korrektur des α -Fehlers nach Bonferroni. Die statistische Überprüfung von Zusammenhängen zwischen zwei nicht-parametrischen Variablen erfolgte mit dem Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman. Die Analyse der Auswirkungen verschiedener Variablen auf die Überlebenszeit wurde mit dem Cox-Proportional-Hazard-Modell berechnet. Alle Werte wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Ein P-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant definiert und entsprechend in den Abbildungen gekennzeichnet.

6 Ergebnisse

6.1 Einfluss der CK2-Inhibition auf die NG2-Expression im JA

Eine verstärkte Expression des Proteoglykans NG2 fördert maßgeblich die Progression von Tumoren [14, 20, 22, 169]. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die NG2-vermittelte Angiogenese und Proliferation durch eine CK2-Inhibition in Perizyten und GBM-Zellen gehemmt wird [38, 39]. Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss der CK2-Inhibition auf die NG2-Expression, Zellproliferation und Zellmigration im JA analysiert. Hierzu wurde die Expression von NG2, CK2 α und CK2 β in primären JA-Gewebeproben und JA-Zellkulturen bestimmt. Weiterhin wurde der Einfluss der CK2-Inhibitoren CX-4945 und SGC-CK2-1 auf die Zellproliferation und Zellmigration mittels WST-1-Assay, BrdU-Assay und Sphäroid-Assay untersucht.

6.1.1 Expression von NG2, CK2 α und CK2 β in primärem JA-Gewebe

Zunächst wurde die Expression von NG2, CK2 α und CK2 β in mehreren JA-Gewebeproben analysiert. Dafür wurden CD31-, Vimentin-, NG2- und CK2-exprimierende Zellen in JA1-Gewebeschnitten mittels immunhistochemischer Färbungen detektiert und der Anteil an positiven Zellen quantifiziert (*Abbildung 5A und B*).

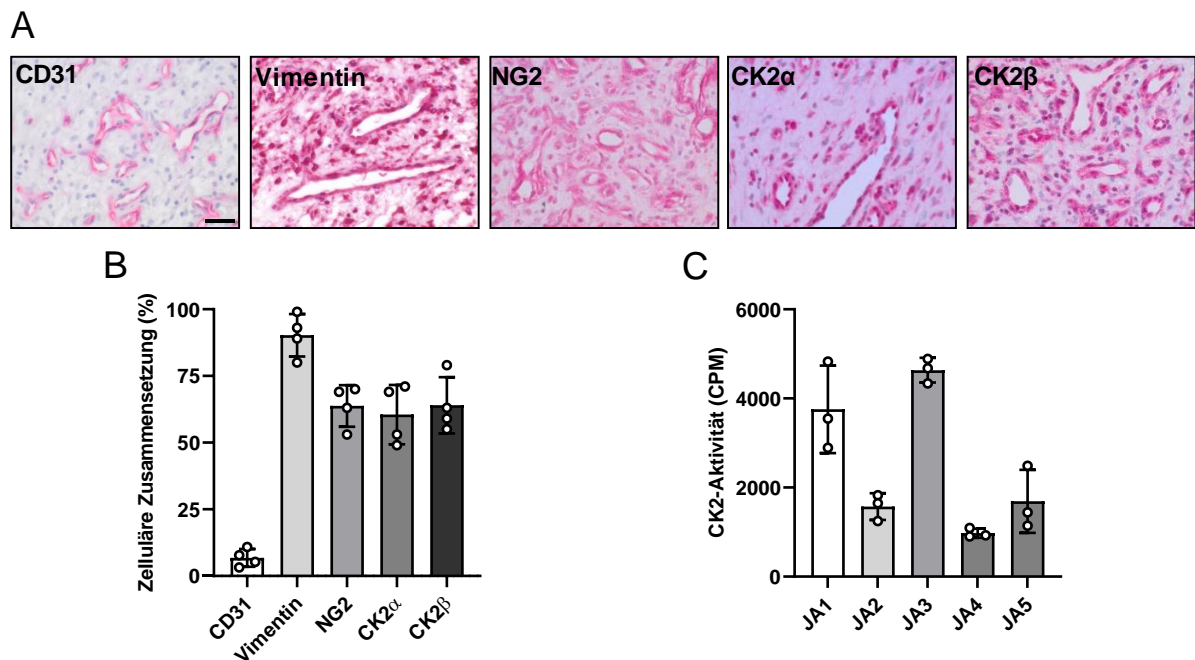


Abbildung 5: Expression von NG2, CK2 α und CK2 β in primärem JA-Gewebe. (A) Immunhistochemische Färbungen der JA1-Gewebeschnitte. CD31, Vimentin, NG2, CK2 α und CK2 β wurden mit entsprechenden Antikörpern detektiert (obere Reihe). Maßstab: 25 μ m. (B) Quantitative Analyse der CD31-, Vimentin-, NG2-, CK2 α - und CK2 β -positiven Zellen in JA1 (in % aller Zellen). MW \pm SD (n = 4). (C) JA-Gewebeproben (JA1-JA5) von fünf verschiedenen Spendern wurden isoliert und Zellextrakt generiert. Anschließend wurde die CK2-Kinaseaktivität (Zählimpulse pro Minute (CPM)) anhand eines Phosphorylierungs-Assays bestimmt. MW \pm SD (n = 3).

Die Färbungen bestätigten die charakteristische histopathologische Zusammensetzung des JAs [77]. Die CD31-positiven Endothelzellen kennzeichneten die zahlreichen Blutgefäße, welche von einem dichten Vimentin-positiven Stroma umgeben waren (*Abbildung 5A*). Die Quantifizierung ergab, dass über 50 % der JA1-Gewebezellen Vimentin-, NG2-, CK2 α - und CK2 β -positiv waren und weniger als 10 % der Zellen CD31-positiv (*Abbildung 5B*). Zusätzlich wurde die CK2-Aktivität in JA-Gewebeproben von fünf verschiedenen Spendern (JA1-JA5) mithilfe eines Phosphorylierungs-Assays untersucht. Hierbei konnte in allen Gewebeproben eine enzymatische Aktivität der CK2 nachgewiesen werden, wobei JA1 und JA3 die höchste Aktivität zeigten (*Abbildung 5C*).

Neben den immunhistochemischen Färbungen wurde zudem die Proteinexpression von NG2, CK2 α und CK2 β in fünf primären Gewebeextrakten (JA1-JA5) mittels Western Blot-Analysen untersucht (*Abbildung 6A-C*). Die Ergebnisse zeigten, dass in allen Gewebeextrakten zwar NG2 exprimiert wurde, jedoch die Expressionsstärke variierte. Hierbei wurde der niedrigste NG2-Proteinlevel in JA2-Gewebe detektiert und die höchste NG2-Proteinexpression in JA5-Gewebe (*Abbildung 6A*). Die CK2-Expression konnte in allen Extrakten nachgewiesen werden. Dabei variierte die Expression der regulatorischen CK2 β -Untereinheit in den Geweben stärker als die der katalytischen CK2 α -Untereinheit (*Abbildung 6B und C*).

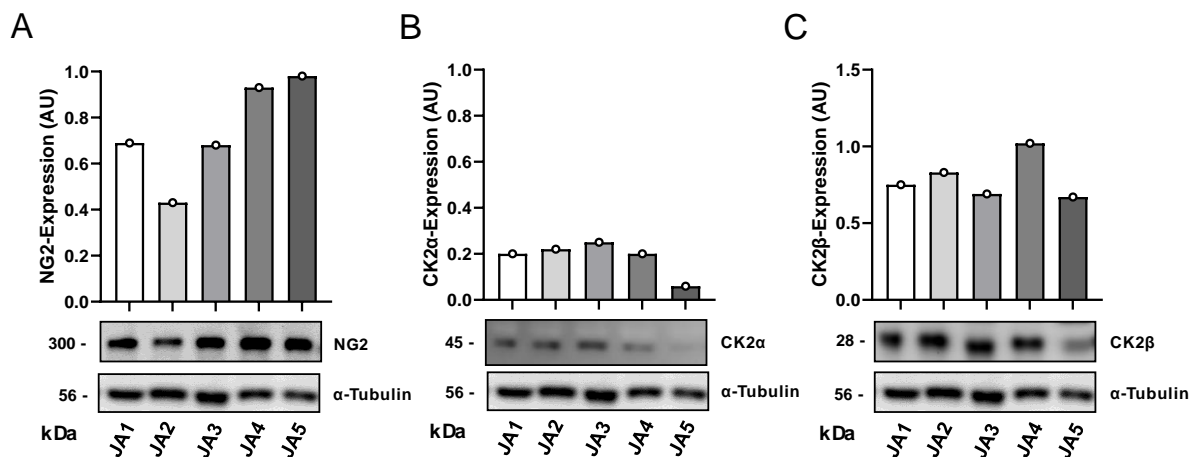


Abbildung 6: Expression von NG2, CK2 α und CK2 β in primärem JA-Gewebe. (A-C) Aus fünf JA-Gewebeproben (JA1-JA5) wurden Zellextrakte generiert und der Proteingehalt von NG2 (A), CK2 α (B), CK2 β (C) und α -Tubulin (Ladekontrolle) mittels Western Blot bestimmt. Quantitative Analyse der Expression (arbitrary units (AU)) von NG2, CK2 α und CK2 β normiert auf α -Tubulin (n = 1).

6.1.2 Expression von NG2, CK2 α und CK2 β in primären JA-Zellen

Für die folgenden *in vitro* Analysen wurden aus vier JA-Gewebeproben (JA1-JA4) Zellkulturen (JA1-JA4) generiert, um den Einfluss der CK2-Inhibition auf die Zellmigration und die Zellproliferation zu analysieren. Die JA-Zellen wiesen in lichtmikroskopischen Aufnahmen einen Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp mit einer multipolaren Struktur auf (*Abbildung 7*). Zusätzlich konnten NG2- und Vimentin-positive Signale in allen Zellen mittels Immunfluoreszenz-Färbungen visualisiert werden (*Abbildung 7*).

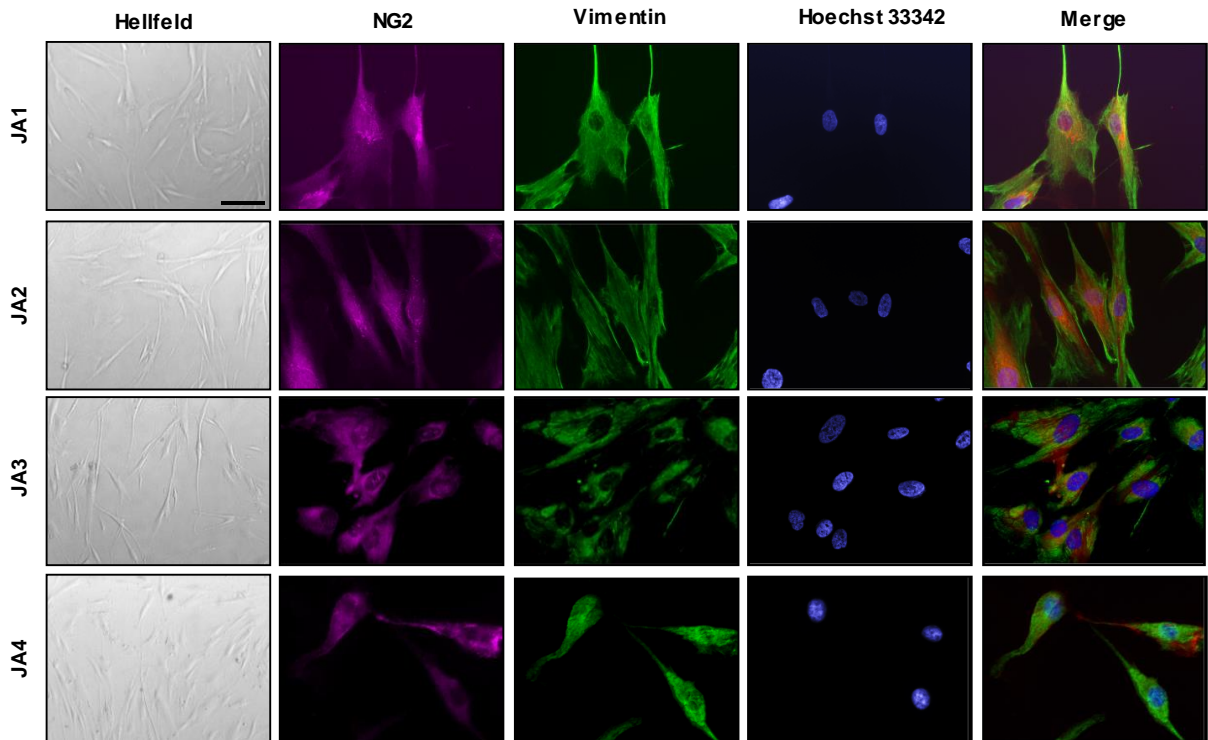


Abbildung 7: Immunfluoreszenz-Färbungen von NG2 und Vimentin in primären JA-Zellen. Für die Immunfluoreszenz-Färbungen wurden die JA1-JA4-Zellen mit 4 % PFA fixiert, mit NG2- (pink) und Vimentin-Primärantikörper (grün) und anschließend mit Sekundärantikörper inkubiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) visualisiert. Repräsentative Hellfeld und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sowie die Überlagerung (Merge) der drei Kanäle. Maßstab: 50 μ m.

Weiterhin wurde mittels Western Blot-Analysen die NG2- und CK2-Proteinexpression in JA-Zellextrakten untersucht. Diese zeigten, dass alle JA-Zellextrakte sowohl NG2 als auch die beiden CK2-Untereinheiten CK2 α und CK2 β exprimieren (*Abbildung 8A-C*).

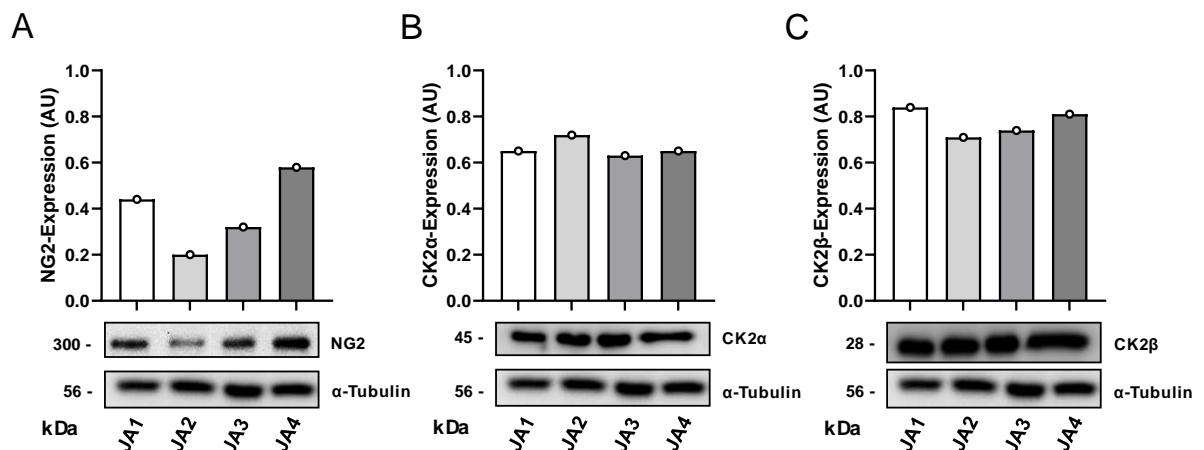


Abbildung 8: Expression von NG2, CK2 α und CK2 β in primären JA-Zellen. (A-C) Aus JA1-JA4-Zellen wurden Zellextrakte generiert und der Proteingehalt von NG2 (A), CK2 α (B), CK2 β (C) und α -Tubulin (Ladekontrolle) mittels Western Blot bestimmt. Quantitative Analyse der Expression (arbitrary units (AU)) von NG2, CK2 α und CK2 β normiert auf α -Tubulin (n = 1).

Die NG2-Expression variierte in den JA-Zellen, wobei JA2-Zellen den niedrigsten und JA4-Zellen den höchsten NG2-Proteinlevel aufwiesen, sodass ein ähnliches Expressionsmuster zu

sehen war wie in den entsprechenden JA-Gewebeproben (*Abbildung 8A*). Die CK2 α - und CK2 β -Expression unterschied sich in den JA-Zellen nicht (*Abbildung 8B und C*).

Zusätzlich wurde der Proteingehalt von NG2 auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch nachgewiesen. Die JA-Zellen zeigten Unterschiede in der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von NG2. Ähnlich wie in den Western Blot-Analysen wiesen JA2-Zellen den niedrigsten und JA4-Zellen den höchsten NG2-Proteinlevel auf (*Abbildung 9A*). Des Weiteren wurde der NG2 mRNA-Gehalt mittels qPCR-Analysen untersucht. Dort zeigten die JA4-Zellen den höchsten NG2-mRNA-Gehalt im Vergleich zu den anderen JA-Zellkulturen. Der niedrigste NG2-mRNA-Gehalt wurde in den JA1-Zellen detektiert, gefolgt von den JA2- und JA3-Zellen (*Abbildung 9B*).

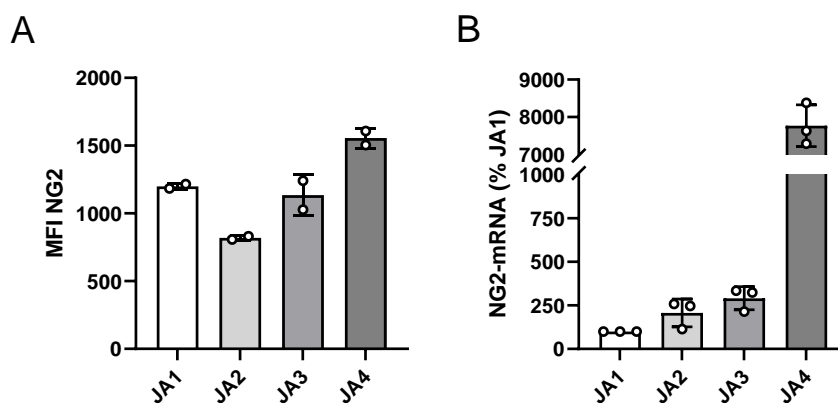


Abbildung 9: Zelloberflächen- und Genexpression von NG2 in primären JA-Zellen. (A) JA1-JA4-Zellen wurden geerntet, mit einem PE-konjugierten anti-NG2-Antikörper gefärbt und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von NG2 auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch detektiert. MW \pm SD (n = 2). (B) JA1-JA4-Zellen wurden geerntet, die RNA isoliert und der mRNA-Gehalt von NG2 und GAPDH (Ladekontrolle) mittels qPCR bestimmt. Quantitative Analyse des mRNA-Gehalts von NG2 normiert auf GAPDH (in % zu JA1). MW \pm SD (n = 3).

6.1.3 CK2-Inhibition reduziert die Zellproliferation von JA-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die untersuchten JA-Zellen die CK2 und das Proteoglykan NG2 exprimieren, wurde in den folgenden Versuchen analysiert, inwieweit eine CK2-Inhibition einen Einfluss auf die Zellproliferation und Zellmigration hat. Der Effekt der CK2-Inhibitoren CX-4945 und SGC-CK2-1 auf die mitochondriale Aktivität, als Indikator der Zellviabilität, wurde in JA1- und JA2-Zellen mittels WST-1-Assays untersucht. Hierzu wurden die Zellen für 24 h und 48 h mit verschiedenen CX-4945 und SGC-CK2-1 Konzentrationen (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M) behandelt und die mitochondriale Aktivität gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass nach 24 h CX-4945-Konzentrationen von 5 μ M und 10 μ M die mitochondriale Aktivität der JA1-Zellen im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrollen signifikant reduzieren (*Abbildung 10A*). Nach 48 h verringerte sowohl CX-4945 als auch SGC-CK2-1 die Formazan-Reduktion in JA1-Zellen bei allen Konzentrationen signifikant (*Abbildung 10B*). Im Gegensatz dazu reduzierten 5 μ M und 10 μ M CX-4945 und SGC-CK2-1 in JA2-Zellen sowohl nach 24 h als auch nach 48 h die mitochondriale Aktivität (*Abbildung 10C und D*).

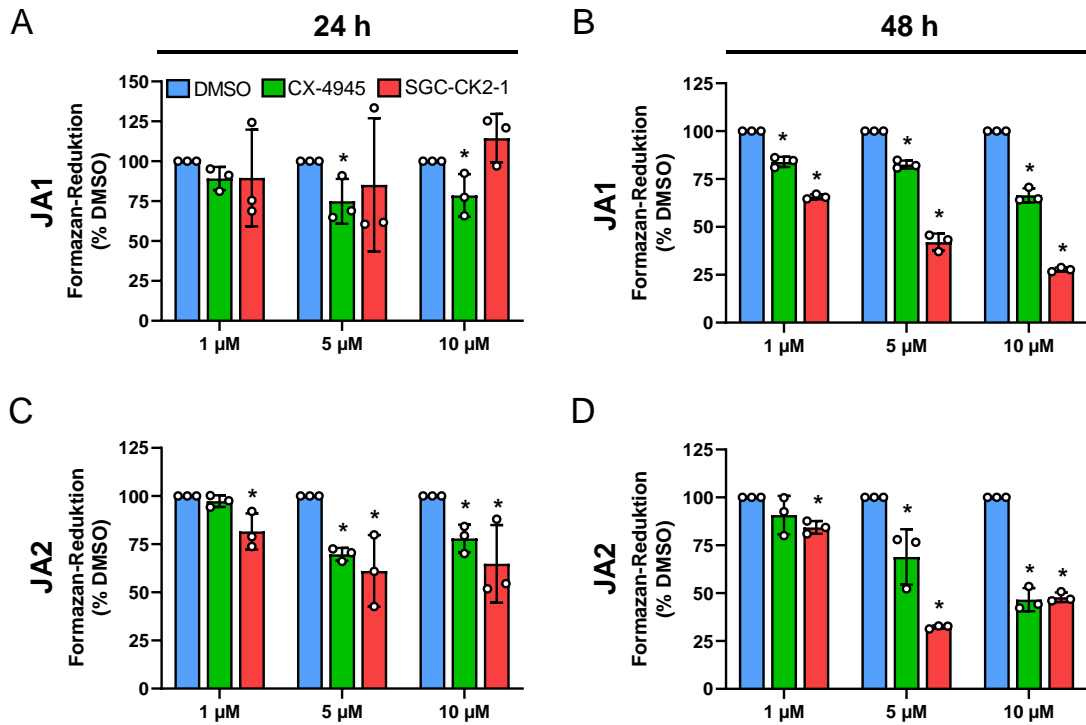


Abbildung 10: CK2-Inhibition reduziert die Zellviabilität in primären JA1- und JA2-Zellen. (A-D) JA1-Zellen (A und B) und JA2-Zellen (C und D) wurden mit 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M DMSO (blau), CX-4945 (grün) oder SGC-CK2-1 (rot) behandelt. Nach 24 h (A und C) und nach 48 h (B und D) wurde die Formazan-Reduktion mittels WST-1-Assays bestimmt (in % zu DMSO). Quantitative Analyse der Formazan-Reduktion normiert auf DMSO. MW \pm SD. *P < 0,05 vs. DMSO (n = 3).

Insgesamt wurde die niedrigste mitochondriale Aktivität in den JA1- und JA2-Zellen mit 10 μ M CX-4945 und 5 μ M SGC-CK2-1 nach 48 h detektiert (Abbildung 10B und D). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für alle folgenden *in vitro* Analysen die JA-Zellen für 48 h mit 10 μ M CX-4945 und 5 μ M SGC-CK2-1 behandelt.

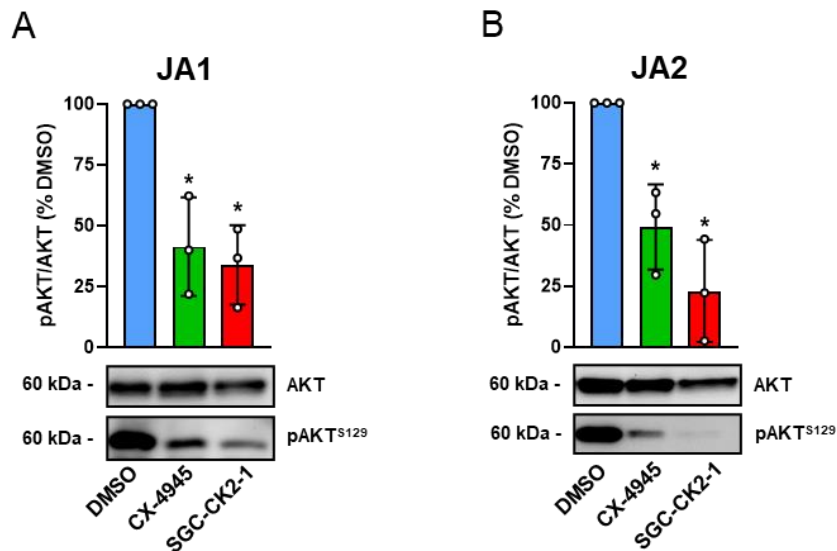


Abbildung 11: CK2-Inhibition reduziert die AKT^{S129}-Phosphorylierung in primären JA1- und JA2-Zellen. (A und B) JA1-Zellen (A) und JA2-Zellen (B) wurden für 48 h mit DMSO (blau), CX-4945 (10 μ M; grün) oder SGC-CK2-1 (5 μ M; rot) behandelt. Danach wurden Zellextrakte generiert und der Proteingehalt von pAKT^{S129} und AKT (Ladkontrolle) mittels Western Blot bestimmt. Quantitative Analyse der Expression von pAKT^{S129} normiert auf AKT (in % zu DMSO). MW \pm SD. *P < 0,05 vs. DMSO (n = 3).

Nachdem die Konzentrationen der CK2-Inhibitoren festgelegt wurden, wurde im Anschluss die CK2-Inhibition mittels der CK2-spezifischen Phosphorylierung von AKT an der Aminosäure Serin 129 (pAKT^{S129}) mittels Western Blot-Analysen verifiziert [65]. Diese zeigten, dass sowohl die CX-4945- als auch die SGC-CK2-1-Behandlung zu einer Reduktion der CK2-Phosphorylierung an AKT^{S129} in JA1- und JA2-Zellen führt (*Abbildung 11A und B*).

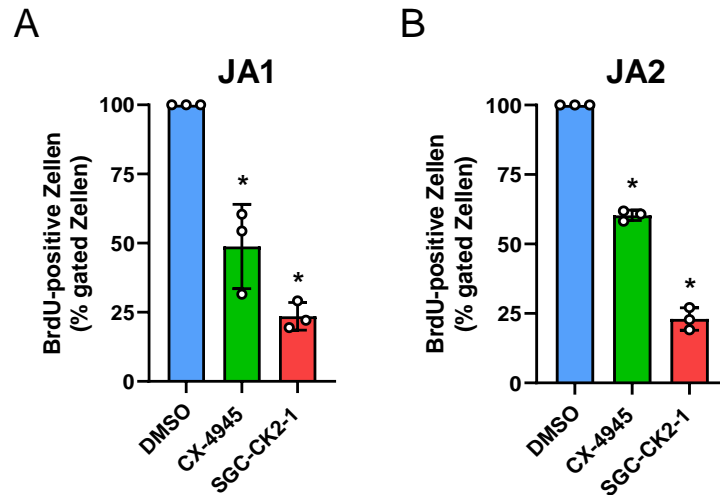


Abbildung 12: CK2-Inhibition reduziert die Zellproliferation in primären JA1- und JA2-Zellen. (A-B) JA1-Zellen (A) und JA2-Zellen (B) wurden mit DMSO (blau), CX-4945 (10 μ M; grün) oder SGC-CK2-1 (5 μ M; rot) für 48 h und zusätzlich mit BrdU (10 μ M) für 16 h behandelt. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, mit einem FITC-konjugierten anti-BrdU-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Quantitative Auswertung der BrdU-positiven JA1- und JA2-Zellen (in % zu DMSO). MW \pm SD. *P < 0,05 vs. DMSO (n = 3).

Die anti-proliferative Wirkung der CK2-Inhibitoren CX-4945- und SGC-CK2-1 wurde mithilfe eines BrdU-Assays durchflusszytometrisch untersucht. Dafür wurden JA1- und JA2-Zellen für 48 h mit CX-4945- und SGC-CK2-1 und zusätzlich für 16 h mit BrdU behandelt. Hierbei führte die Behandlung der JA1- und JA2-Zellen mit CX-4945 und SGC-CK2-1 zu einer reduzierten Proliferation (*Abbildung 12A und B*). Der Inhibitor SGC-CK2-1 zeigte in beiden Zellpopulationen einen stärkeren anti-proliferativen Effekt als CX-4945.

Eine reduzierte Proliferation kann jedoch auch auf apoptotische Prozesse hinweisen. Daher wurde zusätzlich die Expression der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) und deren Spaltprodukt (cPARP-1) als apoptotischer Marker mittels Western Blot-Analyse bestimmt [170, 171]. Die Ergebnisse zeigten, dass die Behandlung der JA1- und JA2-Zellen mit CX-4945 und SGC-CK2-1 zu einem tendenziellen, aber nicht signifikanten Anstieg von cPARP führt (*Abbildung 13A und B*).

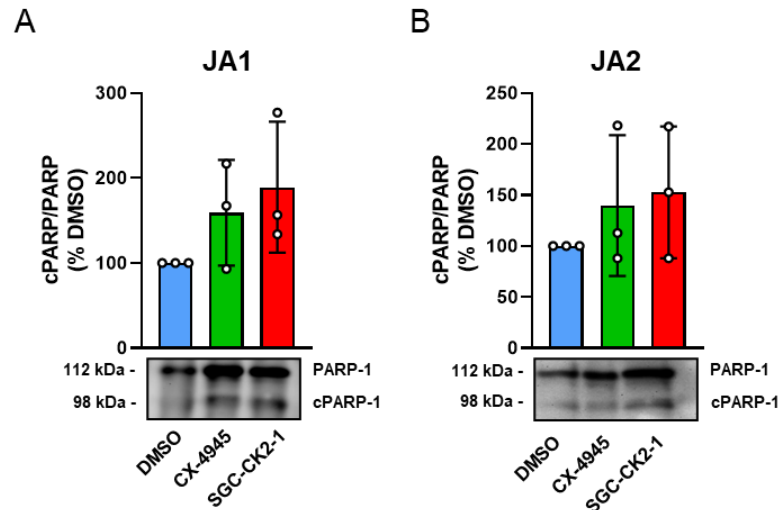


Abbildung 13: CK2-Inhibition beeinflusst die PARP-Spaltung in primären JA1- und JA2-Zellen. (A und B) JA1-Zellen (A) und JA2-Zellen (B) wurden für 48 h mit DMSO (blau), CX-4945 (10 μ M; grün) oder SGC-CK2-1 (5 μ M; rot) behandelt. Danach wurden Zellextrakte generiert und der Proteingehalt von cPARP und PARP (Ladekontrolle) mittels Western Blot bestimmt. Quantitative Analyse der Expression von cPARP normiert auf PARP (in % zu DMSO). MW \pm SD (n = 3).

6.1.4 Einfluss der CK2-Inhibition auf die Expression von NG2 und CK2 in JA-Zellen

Der Effekt der CK2-Hemmstoffe CX-4945 und SGC-CK2-1 auf die NG2-Expression wurde mittels Western Blot- und qPCR-Analysen untersucht. Die Ergebnisse der Western Blot-Analysen ergaben für beide CK2-Inhibitoren einen reduzierten NG2-Proteingehalt im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen (*Abbildung 14A und B*). Die zusätzlichen qPCR-Untersuchungen zeigten, dass auch auf mRNA-Ebene die NG2-Expression reprimiert wird (*Abbildung 14C und D*).

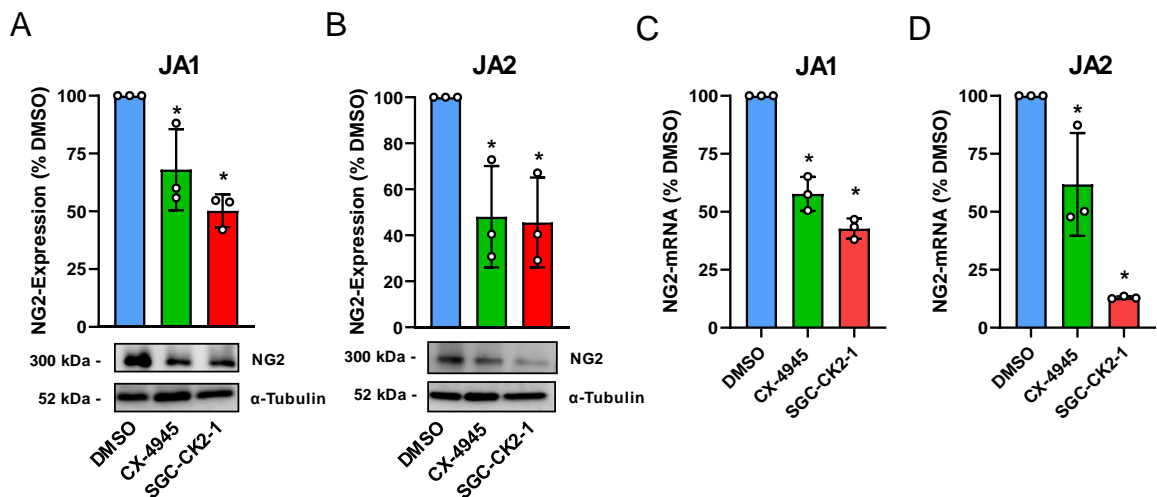


Abbildung 14: CK2-Inhibition reduziert die NG2-Expression in primären JA1- und JA2-Zellen. (A und B) JA1-Zellen (A) und JA2-Zellen (B) wurden für 48 h mit DMSO (blau), CX-4945 (10 μ M; grün) oder SGC-CK2-1 (5 μ M; rot) behandelt. Danach wurden Zellextrakte generiert und der Proteingehalt von NG2 und α -Tubulin (Ladekontrolle) mittels Western Blot bestimmt. Quantitative Analyse der Expression von NG2 normiert auf α -Tubulin (in % zu DMSO). MW \pm SD. *P < 0,05 vs. DMSO (n = 3). (C und D) JA1-Zellen (C) und JA2-Zellen (D) wurden wie in (A und B) beschrieben behandelt. Nach 48 h wurde die RNA isoliert und der mRNA-Gehalt von NG2 und GAPDH (Ladekontrolle) mittels qPCR bestimmt. Quantitative Analyse des mRNA-Gehalts von NG2 normiert auf GAPDH (in % zu DMSO). MW \pm SD. *P < 0,05 vs. DMSO (n = 3).

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass durch die CK2-Inhibition die NG2-Expression reduziert wird. Ausgehend davon sollte als nächstes untersucht werden, ob die CK2-Inhibitoren CX-4945- und SGC-CK2-1 nur die enzymatische Aktivität der CK2 beeinflussen oder auch die Expression der CK2-Untereinheiten. Hierfür wurde von CX-4945- und SGC-CK2-1-behandelten JA1- und JA2-Zellextrakten mittels Western Blot-Analysen der Proteingehalt der CK2 α - und CK2 β -Untereinheiten untersucht (Abbildung 15A). Die Analysen zeigten, dass die CX-4945- und SGC-CK2-1-Behandlung den CK2 α - und CK2 β -Proteingehalt nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 15B-E).

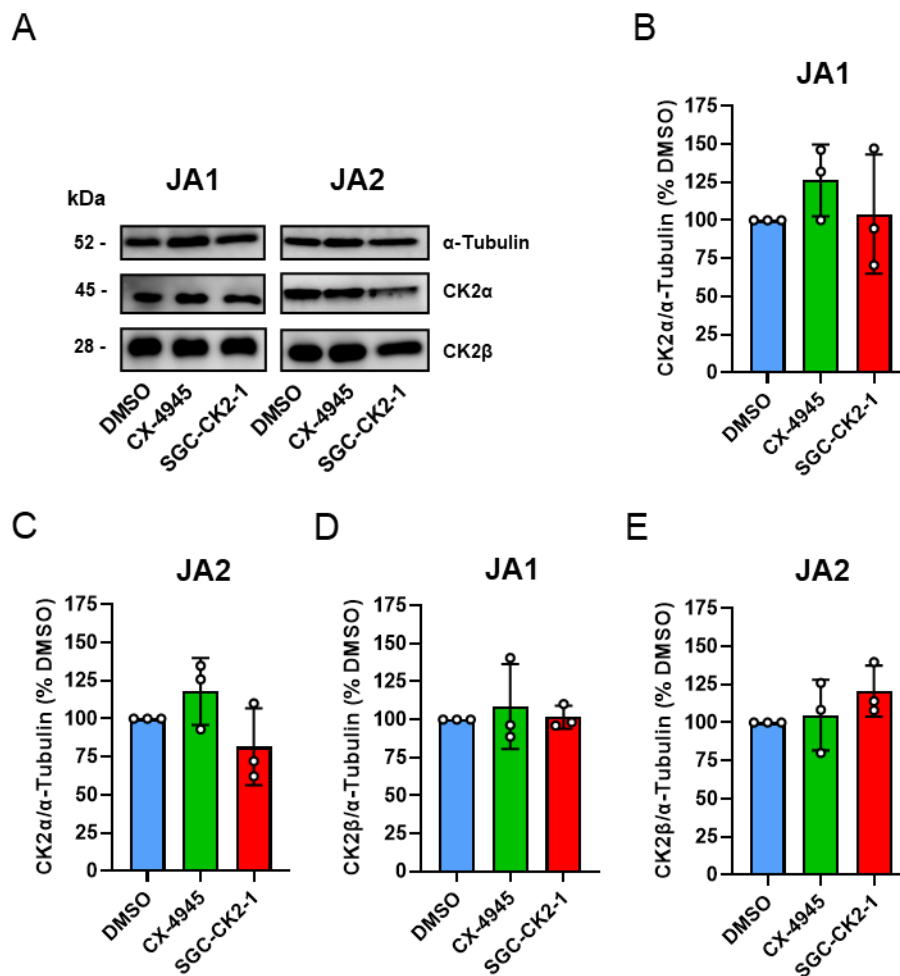


Abbildung 15: CK2-Inhibition hat keinen Einfluss auf die CK2 α - und CK2 β -Expression in primären JA1- und JA2-Zellen. (A) JA1- und JA2-Zellen wurden für 48 h mit DMSO (blau), CX-4945 (10 μ M; grün) oder SGC-CK2-1 (5 μ M; rot) behandelt. Danach wurden Zellextrakte generiert und der Proteingehalt von CK2 α , CK2 β und α -Tubulin (Ladekontrolle) mittels Western Blot bestimmt. (B-C) Quantitative Analyse der Expression von CK2 α in JA1-Zellen (B) und JA2-Zellen (C) normiert auf α -Tubulin (in % zu DMSO). MW \pm SD (n = 3). (D-E) Quantitative Analyse des Proteingehalts von CK2 β in JA1-Zellen (D) und JA2-Zellen (E) normiert auf α -Tubulin (in % zu DMSO). MW \pm SD (n = 3).

6.1.5 CK2-Inhibition reduziert die Zellaussprossung von JA-Sphäroiden

Die Interaktion von NG2 mit Proteinen der extrazellulären Matrix aktiviert die Zellmigration [172-175]. Ein weiteres Ziel war es daher, mittels eines *spheroid sprouting*-Assays den Effekt

der CK2-abhängigen Reduktion des NG2-Proteingehaltes auf die Zellmigration zu analysieren. Das *spheroid sprouting*-Assay ist eine etablierte *in vitro* Methode, um die Wirkung von pharmazeutischen Substanzen auf die Angiogenese und Migration zu analysieren [167, 176]. Hierfür wurden JA1- und JA2-Sphäroide in eine Kollagenmatrix eingebettet und deren Sprossungskapazität lichtmikroskopisch visualisiert. Nach 48 h wurde bei allen JA-Sphäroiden eine Aussprossung in die Kollagenmatrix detektiert. Hierbei zeigten die JA1-Sphäroide eine größere Sprossungsfläche als die JA2-Sphäroide (*Abbildung 16A*). Durch die CX-4945- und SGC-CK2-1-Behandlung konnte die Aussprossung der JA1- und JA2-Sphäroide signifikant reduziert werden (*Abbildung 16B und C*).

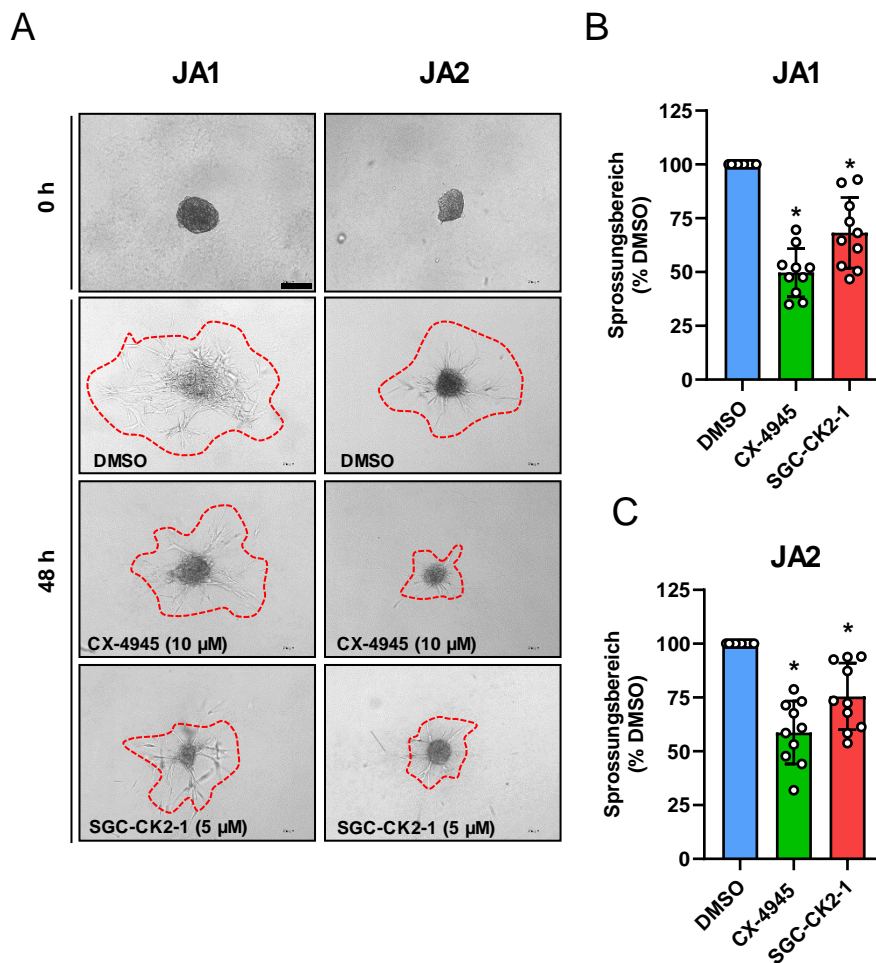


Abbildung 16: CK2-Inhibition reduziert das Aussprossen von primären JA1- und JA2-Sphäroiden. (A) Aus 500 JA1- und JA2-Zellen wurden Sphäroide generiert und anschließend für 48 h mit DMSO (blau), CX-4945 (10 μ M; grün) oder SGC-CK2-1 (5 μ M; rot) behandelt. Die Sprossungsfläche (rot gestrichelte Linie) der JA1-Sphäroide (links) und JA2-Sphäroide (rechts) wurde nach 0 h und 48 h lichtmikroskopisch detektiert (Maßstab: 100 μ m). (B und C) Quantitative Analyse der Sprossungsfläche der JA1-Sphäroide (B) und der JA2-Sphäroide (C) (in % zu DMSO). MW \pm SD. *P < 0,05 vs. DMSO (n = 10).

6.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer CK2-Inhibition auf die NG2-Expression, die Proliferation und die Migration von JA-Zellen analysiert. Zunächst

konnte die Expression von CK2 und NG2 in primären JA-Gewebeproben und generierten JA-Zellkulturen mittels verschiedener molekularer Analysen verifiziert werden. Anschließend wurden in den generierten JA-Zellkulturen die Auswirkungen der CK2-Inhibitoren CX-4945 und SGC-CK2-1 untersucht. Dabei konnte mittels qPCR- und Western Blot-Analysen eine reduzierte NG2-Expression in CX-4945- und SGC-CK2-1-behandelten JA-Zellen detektiert werden. Zusätzlich zeigten verschiedenen *in vitro* Untersuchungen, dass die Inhibition der CK2 das Zellwachstum und die migratorische Kapazität von JA-Zellen reduziert.

6.2 MiR-29b als Regulator der NG2-Expression im GBM

Neben der transkriptionellen Ebene, wie im ersten Studienabschnitt gezeigt, finden auch auf posttranskriptioneller Ebene wichtige Mechanismen der NG2-Genregulation statt. Bereits in einer vorangegangenen Masterarbeit wurde aufgrund von *in silico* Analysen die miR-29b als möglicher posttranskriptioneller Regulator der NG2-Genexpression im GBM beschrieben [163]. Da NG2 durch sein Interaktionsnetzwerk einen maßgeblichen Beitrag zur GBM-Tumorprogression leistet, wurde im zweiten Studienabschnitt dieser Arbeit die Genregulation der NG2-Expression durch die miR-29b, die miR-29b-abhängige Regulation von NG2-Interaktionspartnern sowie die Regulation der miR-29b selbst im GBM untersucht.

6.2.1 Expression von NG2 und miR-29b in humanen Gliomen und GBM-Zellen

In adulten Gliomen korreliert die Expression von NG2 positiv mit dem Malignitätsgrad sowie mit einer schlechten Prognose [32, 177]. Daher wurde zu Beginn dieses Studienabschnitts die Expression von NG2 in Gliomen mit WHO-Grad II bis IV untersucht. Hierfür wurde die Online-Datenbank cBioPortal genutzt, welche die *in silico* Expressionsanalyse von Tumorgenom-Datensätzen ermöglicht [178-180]. Es wurden zwei TCGA-Datensätze (Firehose Legacy: Brain Lower Grade Glioma und Cell 2013: Glioblastoma) genutzt, um die NG2-Genexpression im Astrozytom (AC; WHO-Grad II), Oligodendrogliom (ODG; WHO-Grad II/III), anaplastischem Astrozytom (AAC; WHO-Grad III) und GBM (WHO-Grad IV) zu analysieren (*Abbildung 17*).

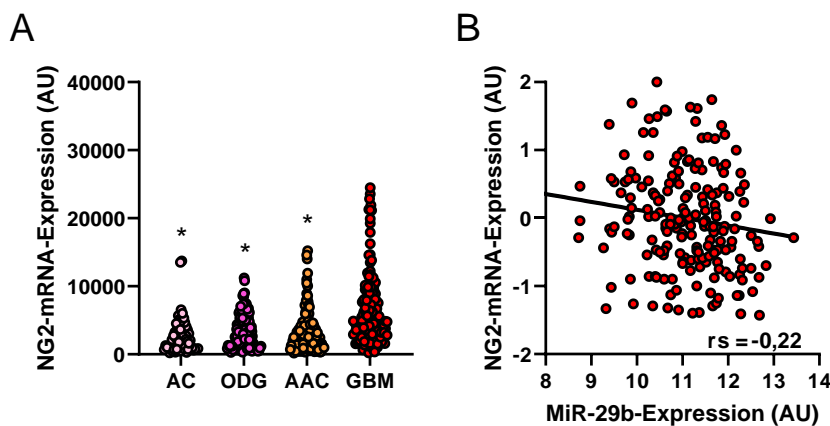


Abbildung 17: NG2 und miR-29b Expression in humanen Gliomen. (A) Die relative NG2 mRNA-Expression (TCGA-basierte Datensätze (Firehose Legacy: Brain Lower Grade Glioma und Cell 2013: Glioblastoma) der cBioPortal Plattform; arbitrary units (AU)) wurde in Gewebeprobe von humanen Astrozytomen (AC; WHO-Grad 2-4; n = 67), Oligodendrogliomen (ODG; WHO-Grad 2/3; n = 120), anaplastischen Astrozytomen (AAC; WHO-Grad 3; n = 130) und GBMs (n = 152) verglichen. *P < 0,05 vs. GBM. (B) Spearman-Korrelation zwischen der NG2-mRNA-Expression und der miR-29b-Expression (TCGA-basierter Datensatz (Nature 2008: Glioblastoma) der cBioPortal Plattform; arbitrary units (AU)). Spearman-Korrelationskoeffizient $r = -0,22$ ($p = 0,002$) (n = 198).

Die Analyse ergab eine signifikant erhöhte NG2-mRNA-Expression im GBM im Vergleich zum AC, ODG und AAC (*Abbildung 17A*). Zusätzlich konnte mithilfe des Glioblastoma TCGA-Datensatzes (Nature 2008) eine Spearman-Korrelation zwischen der miR-29b-Expression und der NG2-Expression erstellt werden [178, 179]. Diese zeigte eine schwache negative

Korrelation zwischen der NG2-Expression und der miR-29b-Expression im GBM (Abbildung 17B).

6.2.2 MiR-29b reduziert die NG2-Expression in humanen GBM-Zellen

Im Rahmen einer vorangegangenen Masterarbeit wurde bereits in ersten *in vitro* Untersuchungen die Expression von NG2 und der miR-29b in den humanen GBM-Zelllinien A1207 und U87 analysiert und deren Expression mit der NG2-negativen humanen embryonalen Nieren-Zelllinie HEK293 verglichen [163]. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass beide GBM-Zelllinien die miR-29b und NG2 exprimieren [163].

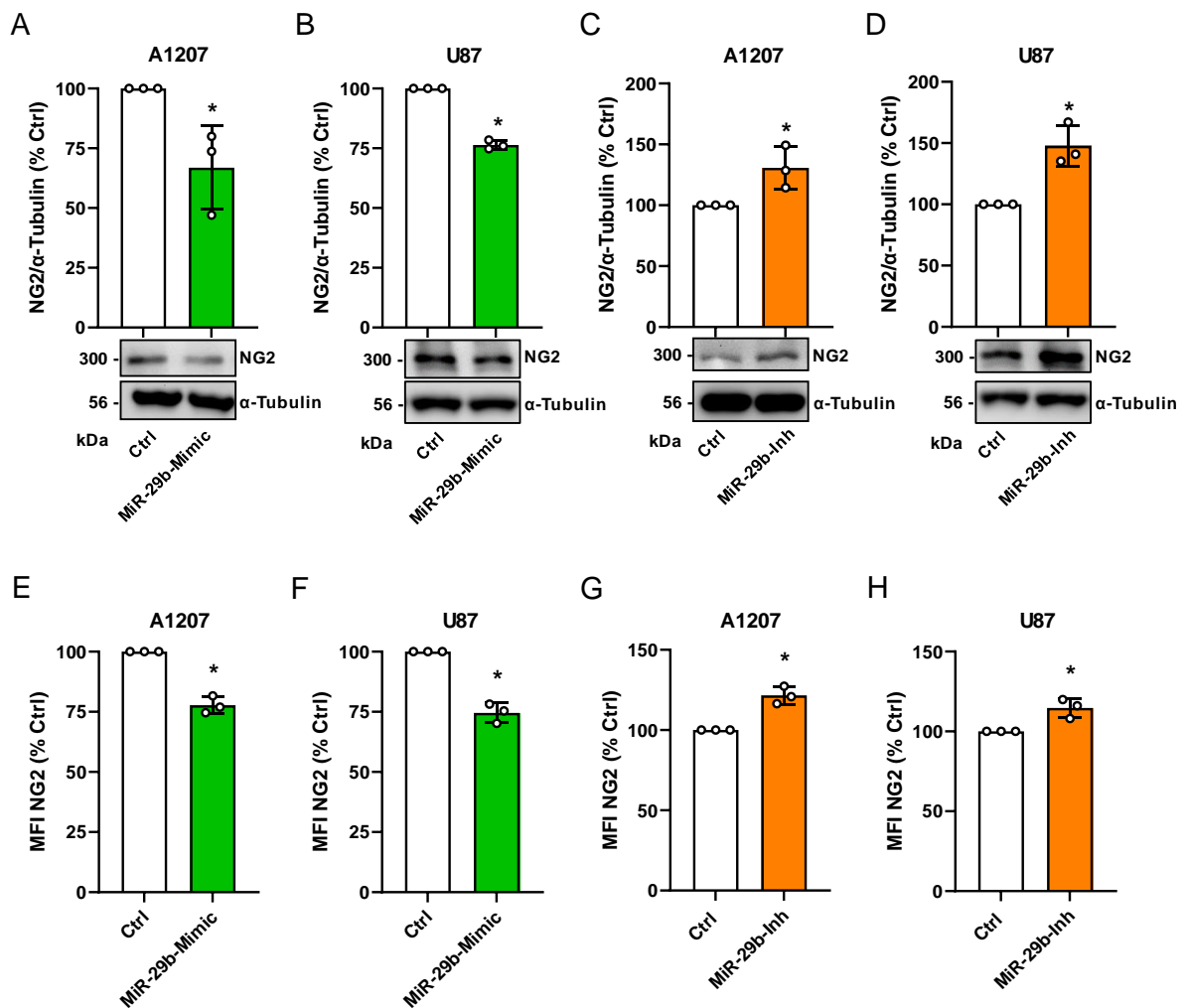


Abbildung 18: MiR-29b beeinflusst den NG2-Proteingehalt in humanen GBM-Zellen. (A-D) A1207- und U87-Zellen wurden mit Ctrl und miR-29b-Mimic (50 nM; grün) oder mit Ctrl und miR-29b-Inh (100 nM; orange) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, Zellextrakte generiert und der Proteingehalt von NG2 und α -Tubulin (Ladekontrolle) mittels Western Blot bestimmt (untere Reihe). Quantitative Analyse der Expression von NG2 normiert auf α -Tubulin (in % zur Ctrl). MW \pm SD. *P < 0,05 vs. Ctrl (n = 3). (E-H) A1207-Zellen und U87-Zellen wurden wie in (A-D) beschrieben transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, mit einem PE-konjugierten anti-NG2-Antikörper gefärbt und der Proteingehalt von NG2 auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch analysiert. MW \pm SD. *P < 0,05 vs. Ctrl (n = 3).

In den ersten *in vitro* Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der regulatorische Einfluss der miR-29b auf die NG2-Expression analysiert. Dafür wurden die

NG2-positiven A1207- und U87-Zellen mit der miR-29b-Mimic und dem miR-29b-Inh transfiziert und anschließend die NG2-Proteinexpression analysiert. Sowohl die Western Blot-Analysen als auch die durchflusszytometrischen Analysen ergaben nach Transfektion der A1207- und U87-Zellen mit miR-29b-Mimic einen reduzierten NG2-Proteingehalt (*Abbildung 18A, B, E und F*). Dagegen führte die Transfektion mit miR-29b-Inh zu einem erhöhten NG2-Proteingehalt (*Abbildung 18C, D, G und H*).

Zusätzlich zu den Expressionsanalysen auf Proteinebene wurden miR-29b-Mimic- und miR-29b-Inh-transfizierte U87- und A1207-Zellen mittels qPCR auf ihren NG2-mRNA-Gehalt untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Überexpression der miR-29b sowohl in den U87-Zellen als auch in den A1207-Zellen zu einem reduzierten NG2-mRNA-Gehalt führt (*Abbildung 19A und B*). Im Gegensatz dazu wurde nach der Inhibition der miR-29b eine Erhöhung des NG2-mRNA-Gehalts nachgewiesen (*Abbildung 19C und D*).

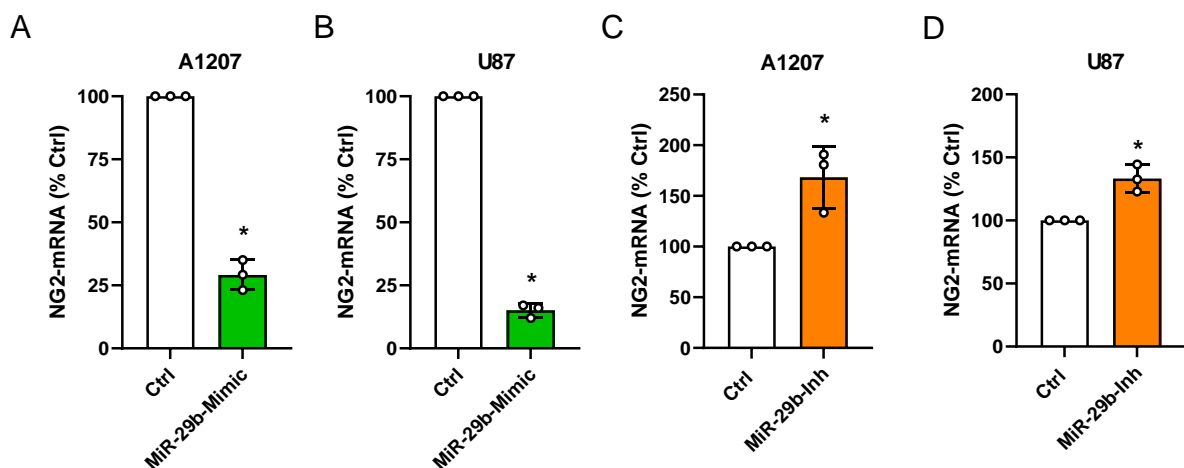


Abbildung 19: MiR-29b beeinflusst den NG2-mRNA-Gehalt in humanen GBM-Zellen. (A-D) A1207- und U87-Zellen wurden mit Ctrl und miR-29b-Mimic (50 nM; grün) oder mit Ctrl und miR-29b-Inh (100 nM; orange) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und der mRNA-Gehalt von NG2 und GAPDH (Ladekontrolle) mittels qPCR bestimmt. Quantitative Analyse des mRNA-Gehalts von NG2 normiert auf GAPDH (in % zur Ctrl). MW \pm SD. *P < 0,05 vs. Ctrl (n = 3).

6.2.3 MiR-29b reduziert posttranskriptionell die NG2-Expression

Nachdem die ersten *in vitro* Analysen zeigten, dass die miR-29b die NG2-Expression reduziert, sollte im nächsten Schritt NG2 als direktes Zielmolekül der miR-29b bestätigt werden. Mittels *in silico* Analyse der Datenbank TargetScan wurde eine konservierte Bindestelle der miR-29b im NG2-3'-UTR identifiziert [163, 168]. Die transkriptionelle Aktivität der NG2-3'-UTR und die direkte Interaktion der miR-29b mit der NG2-3'-UTR wurde mittels Reportergenanalysen untersucht. Dafür wurde die 471 bp große NG2-3'-UTR in den Luciferase-Reportervektor pGL4 kloniert und dessen Aktivität in Luciferase-Assays untersucht (*Abbildung 20A*). Hierbei wurde eine reduzierte Luciferase-Aktivität des WT-NG2-3'UTR-Reportervektors detektiert. Dies deutet auf eine posttranskriptionell aktive 3'-UTR hin (*Abbildung 20B*). Anschließende Cotransfektions-Analysen konnten den Einfluss der miR-29b auf die NG2-3'-

UTR durch eine Reduktion der Luciferase-Aktivität im Vergleich zur Ctrl bestätigen (*Abbildung 20C*). Für den Nachweis, dass die miR-29b spezifisch an die NG2-3'-UTR bindet und diese posttranskriptionell reguliert, wurde die miR-29b-Bindestelle in der NG2-3'-UTR mutiert. Dazu wurde über eine *overlap-extension-PCR* die miR-29b-Seed-Sequenz mutiert und das MUT NG2 3'UTR-Fragment in den Reportervektor pGL4 kloniert (*Abbildung 20A*). Die Cotransfektion der MUT NG2 3'UTR und der miR-29b-Mimic führte zu keiner signifikanten Veränderung der Luciferase-Aktivität im Vergleich zur Ctrl (*Abbildung 20D*). Dieses Ergebnis bestätigt, dass die miR-29b spezifisch mit der NG2-3'-UTR interagiert und posttranskriptionell die NG2-Expression hemmt.

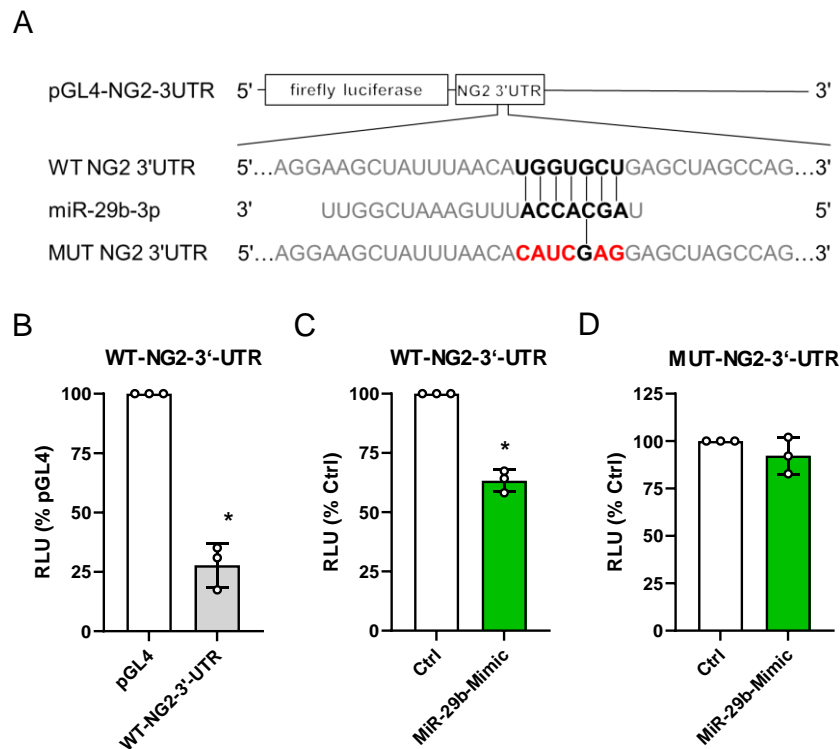


Abbildung 20: MiR-29b reguliert die NG2-Expression posttranskriptionell durch Bindung an die NG2-3'-UTR. (A) Schematische Darstellung des pGL4-NG2-3'-UTR Konstrukts mit dem firefly Luciferase-Gen, der NG2-3'-UTR, der potenziellen Bindestelle der miR-29b (fett schwarz) innerhalb der humanen NG2-3'-UTR-Sequenz und der miR-29b-Sequenz mit der Seed-Sequenz (fett schwarz). Beim MUT-NG2-3'-UTR Konstrukt wurden sechs von sieben Basen der miR-29b Bindestelle innerhalb der NG2-3'UTR-Sequenz mutiert (rot). (B) HEK293-Zellen wurden mit pGL4 (250 ng; weiß) und WT-NG2-3'-UTR (250 ng; grau) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und die relative Lichteinheit (RLU) mittels Luciferase-Assays bestimmt. (C und D) HEK293-Zellen wurden mit WT-NG2-3'-UTR (250 ng; C) bzw. MUT-NG2-3'-UTR (250 ng; D) und Ctrl (100 nM; weiß) und miR-29b-Mimic (100 nM; grün) cotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und die RLU mittels eines Luciferase-Assays bestimmt. MW \pm SD. *P < 0,05 vs. pGL4 bzw. Ctrl (n = 3).

6.2.4 MiR-29b reguliert die NG2-Transkription über Sp1

Neben der Analyse der posttranskriptionellen Regulation von NG2 durch miR-29b wurde auch deren Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von NG2 untersucht. In einer Studie von Schmitt et al. [38] wurde für die Analyse der transkriptionellen Regulation der NG2-Expression der humane NG2-Promotor charakterisiert und dabei unter anderem für den

Transkriptionsfaktor Sp1 eine Bindestelle im Promotor identifiziert. Interessanterweise ist Sp1 ein Target der miR-29b [181]. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde ein indirekter Einfluss der miR-29b auf die transkriptionelle Regulation von NG2 über Sp1 postuliert. Hierfür wurde zunächst mittels qPCR Analysen der Einfluss der miR-29b auf die Sp1-Expression in den GBM-Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass die miR-29b-Mimic den mRNA-Gehalt von Sp1 in den A1207- und U87-Zellen reduziert (*Abbildung 21A und B*). Dagegen war in miR-29b-Inh-transfizierten A1207- und U87-Zellen der Sp1-mRNA-Gehalt erhöht (*Abbildung 21C und D*).

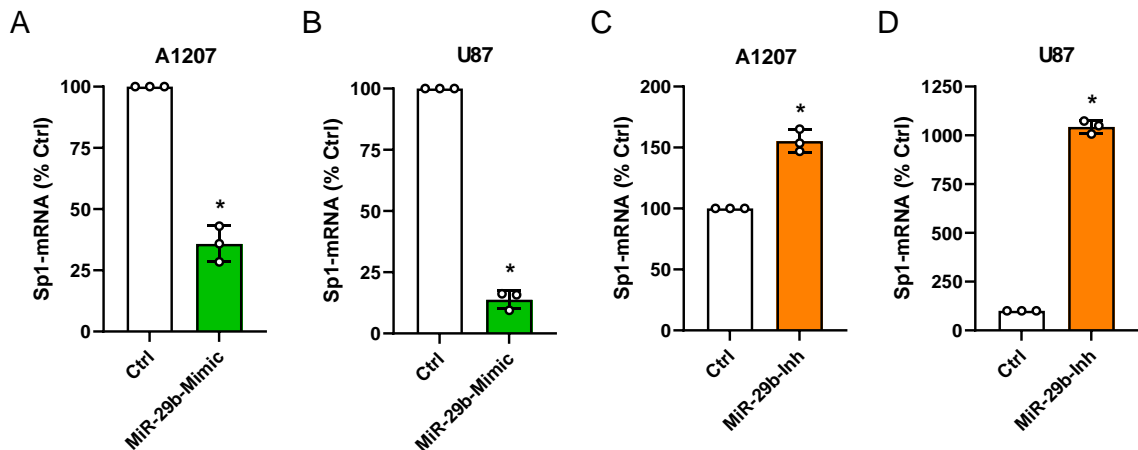


Abbildung 21: MiR-29b beeinflusst die Sp1-Expression in humanen GBM-Zellen. (A-D) A1207- und U87-Zellen wurden mit Ctrl (100 nM; weiß) und miR-29b-Mimic (100 nM; grün) oder mit Ctrl und miR-29b-Inh (100 nM; orange) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und der mRNA-Gehalt von Sp1 und GAPDH (Ladekontrolle) mittels qPCR bestimmt. Quantitative Analyse des mRNA-Gehalts von Sp1 normiert auf GAPDH (in % zur Ctrl). MW \pm SD. *P < 0,05 vs. Ctrl (n = 3).

Mittels Luciferase-Assays wurde der Einfluss der miR-29b auf die transkriptionelle Aktivität des NG2-Promotors analysiert. Hierfür wurden der NG2-Promotor und der Transkriptionsfaktor Sp1 cotransfiziert und die transkriptionelle Aktivität analysiert (*Abbildung 22*).

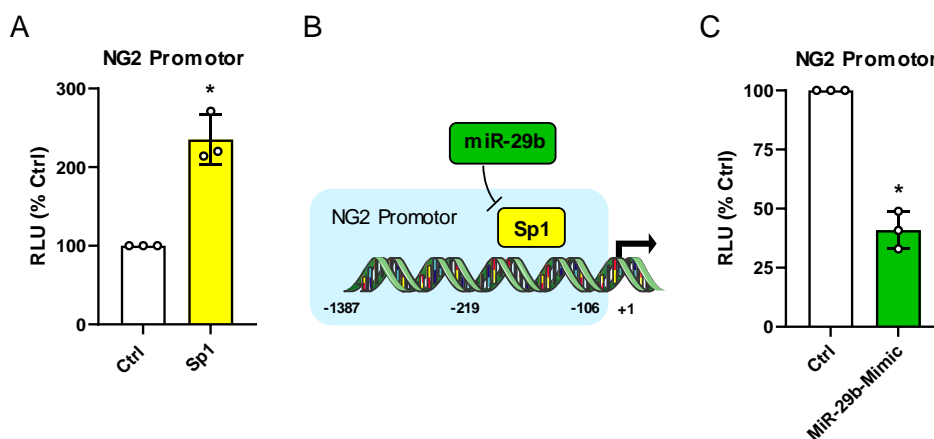


Abbildung 22: MiR-29b reguliert die NG2-Transkription über Sp1. (A) HEK293-Zellen wurden mit dem NG2 Promotor und Ctrl (250 ng; weiß) oder Sp1 (250 ng; gelb) cotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und die relative Lichteinheit (RLU) mittels eines Luciferase-Assays bestimmt. (B) Schematische Darstellung der transkriptionellen Regulation der NG2-Expression durch Sp1 und miR-29b. Die miR-29b inhibiert posttranskriptionell die Sp1-Expression und beeinflusst damit die transkriptionelle Regulation der NG2-Expression über Sp1. (C) HEK293-Zellen wurden mit dem NG2 Promotor und Ctrl (250 ng; weiß) oder miR-29b-Mimic (50 nM; grün) cotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und die RLU mittels eines Luciferase-Assays bestimmt. MW \pm SD. *P < 0,05 vs. Ctrl (n = 3).

Die Ergebnisse zeigten, dass Sp1 die Luciferase-Aktivität des NG2 Promotors signifikant erhöht (*Abbildung 22A*). Zusätzlich wurde die indirekte transkriptionelle Regulation von NG2 durch die miR-29b über Sp1 analysiert. Dabei wird der Abbau von Sp1 durch die direkte Bindung der miR-29b an dessen mRNA initiiert (*Abbildung 22B*). Für die Untersuchung der Auswirkungen der reduzierten Sp1-Expression wurden HEK293-Zellen mit dem NG2-Promotor und miR-29b-Mimic cotransfiziert und anschließend im Luciferase-Assay analysiert. Die Ergebnisse ergaben, dass die miR-29b-Mimic die transkriptionelle Aktivität des NG2-Promotors reduziert (*Abbildung 22C*).

6.2.5 Expression von NG2, miR-29b und PDGFR α in humanen Gliomen

Als *scaffold*-Protein besitzt NG2 keine eigene katalytische Aktivität und formt mit Interaktionspartnern, wie PDGFR α und Integrin β 1, Proteinkomplexe, die verschiedene Signalkaskaden beeinflussen [14]. Interessanterweise konnte mithilfe von *in silico* Analysen eine Bindestelle der miR-29b in der 3'-UTR von PDGFRA identifiziert werden [168]. In den folgenden Versuchen wurde eine mögliche Regulation der PDGFR α -Expression durch die miR-29b im GBM analysiert.

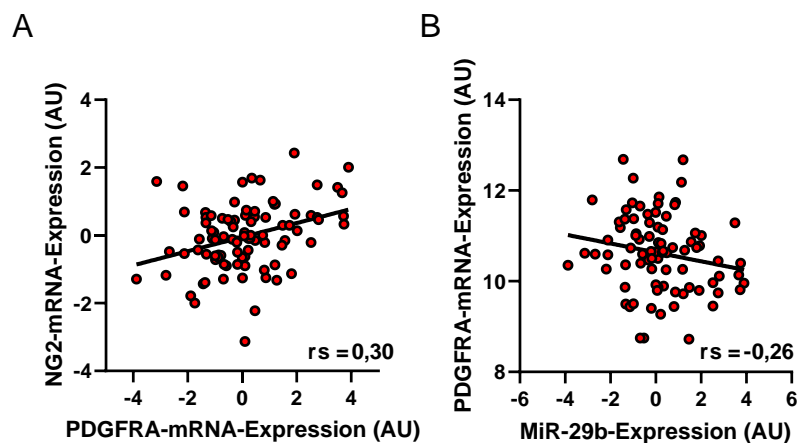


Abbildung 23: PDGFRA-, NG2- und miR-29b-Expression im humanen GBM. (A) Spearman-Korrelation der mRNA-Expression von PDGFRA mit der NG2-Expression (TCGA-basierter Datensatz (Cell 2013: Glioblastoma) der cBioPortal Plattform; arbitrary units (AU)). Spearman-Korrelationskoeffizient $r = 0,3$ ($p = 0,0009$) ($n = 91$). (B) Spearman-Korrelation der mRNA-Expression von miR-29b mit der PDGFRA-Expression (TCGA-basierter Datensatz (Nature 2008: Glioblastoma) der cBioPortal Plattform; arbitrary units (AU)). Spearman-Korrelationskoeffizient $r = 0,26$ ($p = 0,087$) ($n = 84$).

Dafür wurde zunächst die PDGFRA-Expression mittels TCGA-Datenbankanalysen (Firehose Legacy: Brain Lower Grade Glioma und Cell 2013: Glioblastoma) mit der NG2- und miR-29b-Expression im GBM verglichen [178-180]. Die Korrelationsanalyse nach Spearman ergab eine mittlere positive Korrelation zwischen der NG2- und PDGFRA-Expression ($r = 0,3$; $p = 0,0009$) (*Abbildung 23A*). Zusätzlich zeigte eine Spearman-Analyse zwischen der PDGFRA- und miR-29b-Expression eine schwache negative Korrelation ($r = -0,26$; $p = 0,087$) (*Abbildung 23B*).

6.2.6 MiR-29b reduziert die Expression von PDGFR α - und PDGFR β in humanen GBM-Zellen

Neben PDGFR α wurde auch die Interaktion von NG2 mit PDGFR β untersucht. Zwar ist bis heute keine direkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen bekannt, jedoch sind sie auf Perizyten coexprimiert [182, 183]. Zudem ist PDGFR β ebenfalls in der GBM-Tumorprogression involviert und dessen Expression wird durch die miR-29b negativ reguliert [184-187].

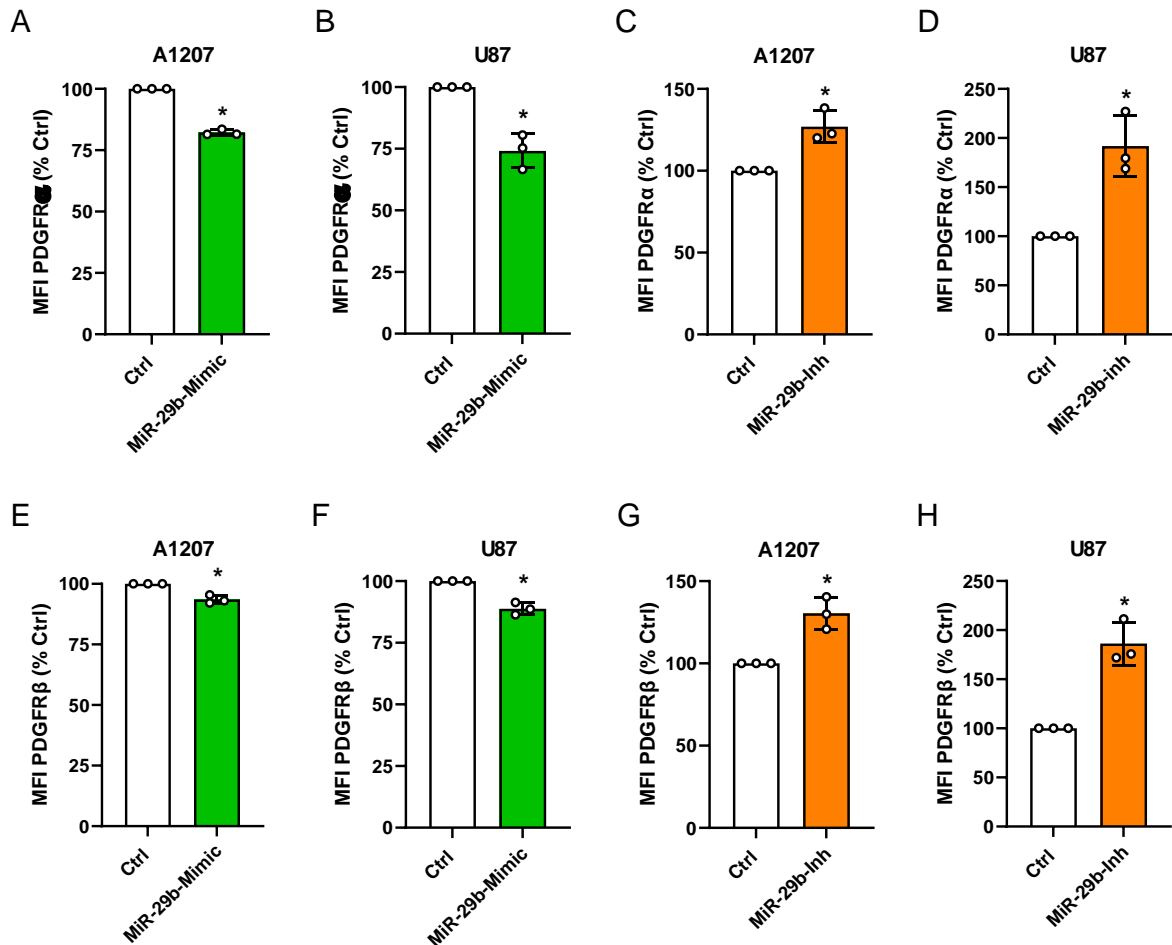


Abbildung 24: MiR-29b reduziert die PDGFR α - und PDGFR β -Expression in humanen GBM-Zellen. (A-H) A1207- und U87-Zellen wurden mit Ctrl und miR-29b-Mimic (50 nM; grün) oder mit Ctrl und miR-29b-Inh (100 nM; orange) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, mit einem PE-konjugierten anti-PDGFR α -Antikörper oder einem PE-konjugierten anti-PDGFR β -Antikörper gefärbt und der Proteingehalt von PDGFR α (A-D) und PDGFR β (E-H) auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch analysiert. MW \pm SD. *P < 0,05 vs. Ctrl (n = 3).

Unter Verwendung von durchflusszytometrischen Analysen wurde zunächst der Einfluss der miR-29b auf die PDGFR α - und PDGFR β -Expression in A1207- und U87-Zellen analysiert. Die miR-29b-Mimic reduzierte sowohl die PDGFR β -Expression als auch die PDGFR α -Expression in beiden Zelllinien (Abbildung 24A, B, E und F). Wie erwartet wurde ein gegenteiliger Effekt nach miR-29b-Inhibition detektiert (Abbildung 24C, D, G und H).

6.2.7 MiR-29b reduziert posttranskriptionell die PDGFR α -Expression

Nachdem auf Proteinebene gezeigt wurde, dass die miR-29b-Mimic die PDGFR α -Expression reduziert, sollte PDGFR α als direktes Zielmolekül der miR-29b identifiziert werden. Die direkte Interaktion der miR-29b mit der 3'-UTR von PDGFRA wurde erneut mittels Reporterassays analysiert. Dafür wurde die 1825 bp große PDGFRA-3'-UTR amplifiziert und in den Luciferase-Reportervektor pGL4 kloniert (*Abbildung 25A*).

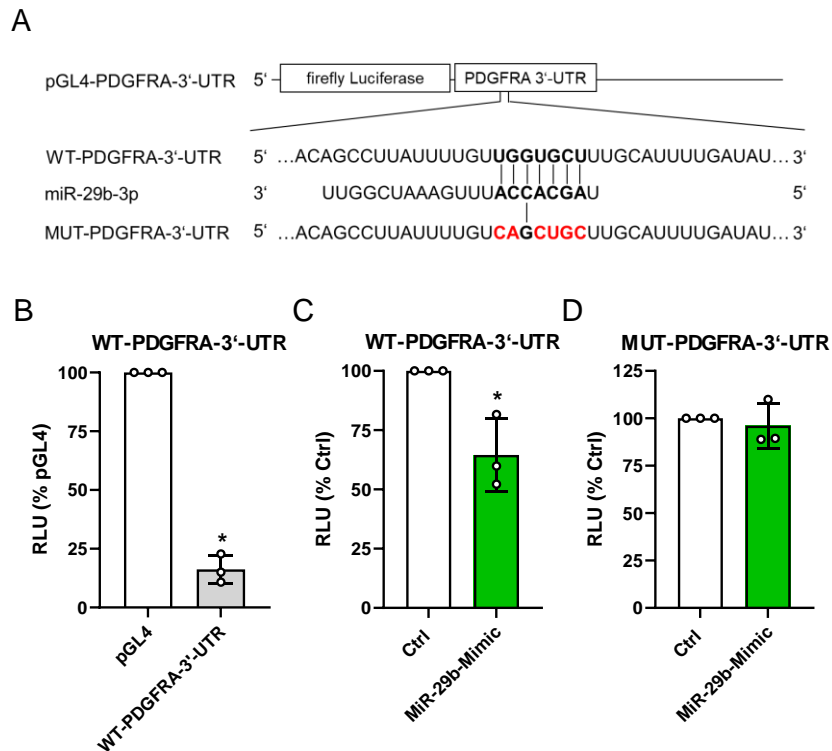


Abbildung 25: MiR-29b reguliert die PDGFR α -Expression posttranskriptionell durch Bindung an die PDGFRA-3'-UTR. (A) Schematische Darstellung des pGL4-PDGFR α -3'-UTR Konstrukts mit dem firefly Luciferase-Gen, der PDGFRA-3'-UTR, der potenziellen Bindestelle der miR-29b (fett schwarz) innerhalb der humanen PDGFRA-3'-UTR-Sequenz und der miR-29b-Sequenz mit Seed-Sequenz (fett schwarz). Beim MUT-PDGFR α -3'-UTR Konstrukt wurden sechs von sieben Basen der miR-29b Bindestelle innerhalb der PDGFRA-3'-UTR-Sequenz mutiert (rot). (B) HEK293-Zellen wurden mit pGL4 (250 ng; weiß) und WT-PDGFR α -3'-UTR (250 ng; grau) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und die relative Lichteinheit (RLU) mittels eines Luciferase-Assays bestimmt. (C und D) HEK293-Zellen wurden mit WT-PDGFR α -3'-UTR (250 ng; C) bzw. MUT-PDGFR α -3'-UTR (250 ng; D) und Ctrl oder miR-29b-Mimic (50 nM; grün) cotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und die relative Lichteinheit (RLU) mittels eines Luciferase-Assays bestimmt. MW \pm SD. *P < 0,05 vs. pGL4 bzw. Ctrl (n = 3).

Die Ergebnisse des Reporterassays zeigten eine Reduktion der Luciferase-Aktivität der WT-PDGFR α -3'-UTR im Vergleich zu pGL4 (*Abbildung 25B*). In anschließenden Cotransfektions-Analysen wurde eine reduzierte Luciferase-Aktivität in miR-29b-Mimic transfizierten HEK293-Zellen detektiert (*Abbildung 25C*). Um nachzuweisen, dass die miR-29b direkt an die PDGFRA-3'-UTR bindet und posttranskriptionell die PDGFRA-Expression reguliert, wurde die miR-29b-Bindestelle in der 3'-UTR mittels *overlap-extension*-PCR mutiert und anschließend in den Reportervektor pGL4 kloniert (*Abbildung 20A*). Die Cotransfektion der MUT-PDGFR α -3'-UTR mit miR-29b-Mimic führte zu keiner signifikanten Veränderung der

Luciferase-Aktivität im Vergleich zur Ctrl und bestätigte damit die direkte Interaktion der miR-29b mit der PDGFRA-3'-UTR (Abbildung 25D).

6.2.8 MiR-29b reduziert die Integrin β 1-Expression in GBM-Zellen

Neben PDGFR α ist auch Integrin β 1 für die NG2-abhängige Signaltransduktion überaus wichtig [8, 10, 19, 102]. Darüber hinaus ist Integrin β 1 ein weiteres Zielmolekül der miR-29 Familie [146, 184]. Jedoch ist die Regulation der Integrin β 1-Expression durch die miR-29b im GBM noch nicht untersucht. Daher wurde zunächst deren Einfluss auf die Integrin β 1-Expression in den GBM-Zelllinien mittels qPCR-Analysen analysiert.

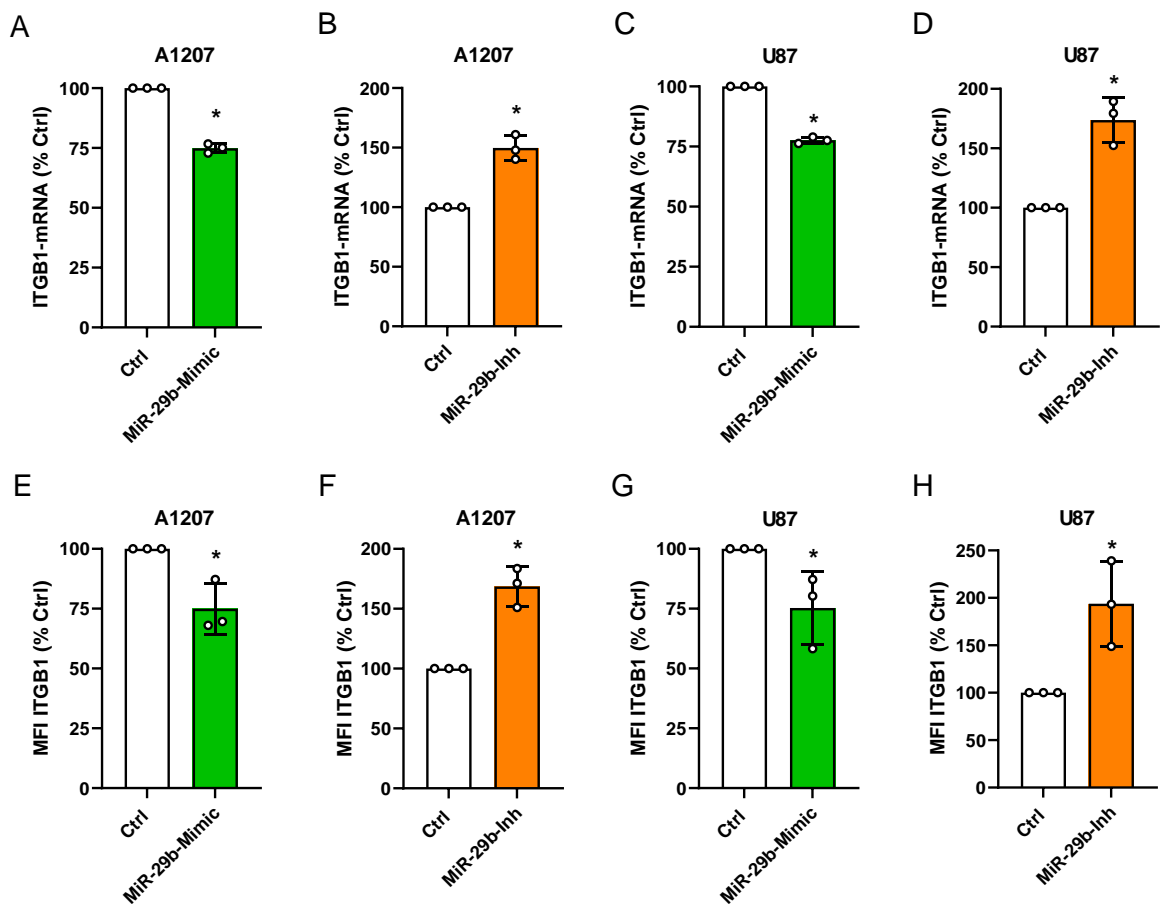


Abbildung 26: MiR-29b reduziert die ITGB1-Expression in humanen A1207- und U87-Zellen. (A-D) A1207- und U87-Zellen wurden mit Ctrl (100 nM; weiß) und miR-29b-Mimic (100 nM; grün) oder mit Ctrl (100 nM; weiß) und miR-29b-Inh (100 nM; orange) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und der mRNA-Gehalt von ITGB1 und GAPDH (Ladekontrolle) mittels qPCR bestimmt. Quantitative Analyse des mRNA-Gehalts von ITGB1 normiert auf GAPDH (in % zur Ctrl). MW \pm SD. *P < 0,05 vs. Ctrl (n = 3). (E-H) A1207- und U87-Zellen wurden wie in (A-D) beschrieben transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, mit einem PE-konjugierten anti-ITGB1-Antikörper gefärbt und der Proteingehalt von ITGB1 auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch analysiert. MW \pm SD. *P < 0,05 vs. Ctrl (n = 3).

Die Transfektion der A1207- und U87-Zellen mit miR-29b-Mimic bzw. miR-29b-Inh führte zur Reduktion bzw. Erhöhung des ITGB1-mRNA-Gehalts (Abbildung 26A-D). Unter Verwendung der Durchflusszytometrie konnten diese Effekte ebenfalls auf Protein-Ebene verifiziert werden (Abbildung 26E-H).

6.2.9 MiR-29b reguliert ein transmembranes Interaktionsnetzwerk

Neben der Expressionsanalyse von NG2 und dessen Interaktionspartnern PDGFR α , PDGFR β und Integrin β 1 wurden deren downstream Signalkaskaden unter Einfluss der miR-29b analysiert. NG2 aktiviert zusammen mit PDGFR α als Corezeptor die PDGF-vermittelte FAK- und MAPK-Signalkaskade [16, 40]. Des Weiteren fördert die NG2-abhängige Integrin β 1-Signalkaskade die Zellproliferation und das Zellüberleben durch die Aktivierung der ERK1/2-, FAK- und PI3K/AKT-Signalwege [19, 102, 188]. Um den Einfluss der miR-29b auf diese Signaltransduktionen zu überprüfen, wurden die aktivierenden Phosphorylierungen an AKT (S473) und FAK (Y397) in miR-29b-Mimic- und miR-29b-Inh-transfizierten A1207- und U87-Zellextrakten mittels Western Blot bestimmt (Abbildung 27A-H) [102, 188].

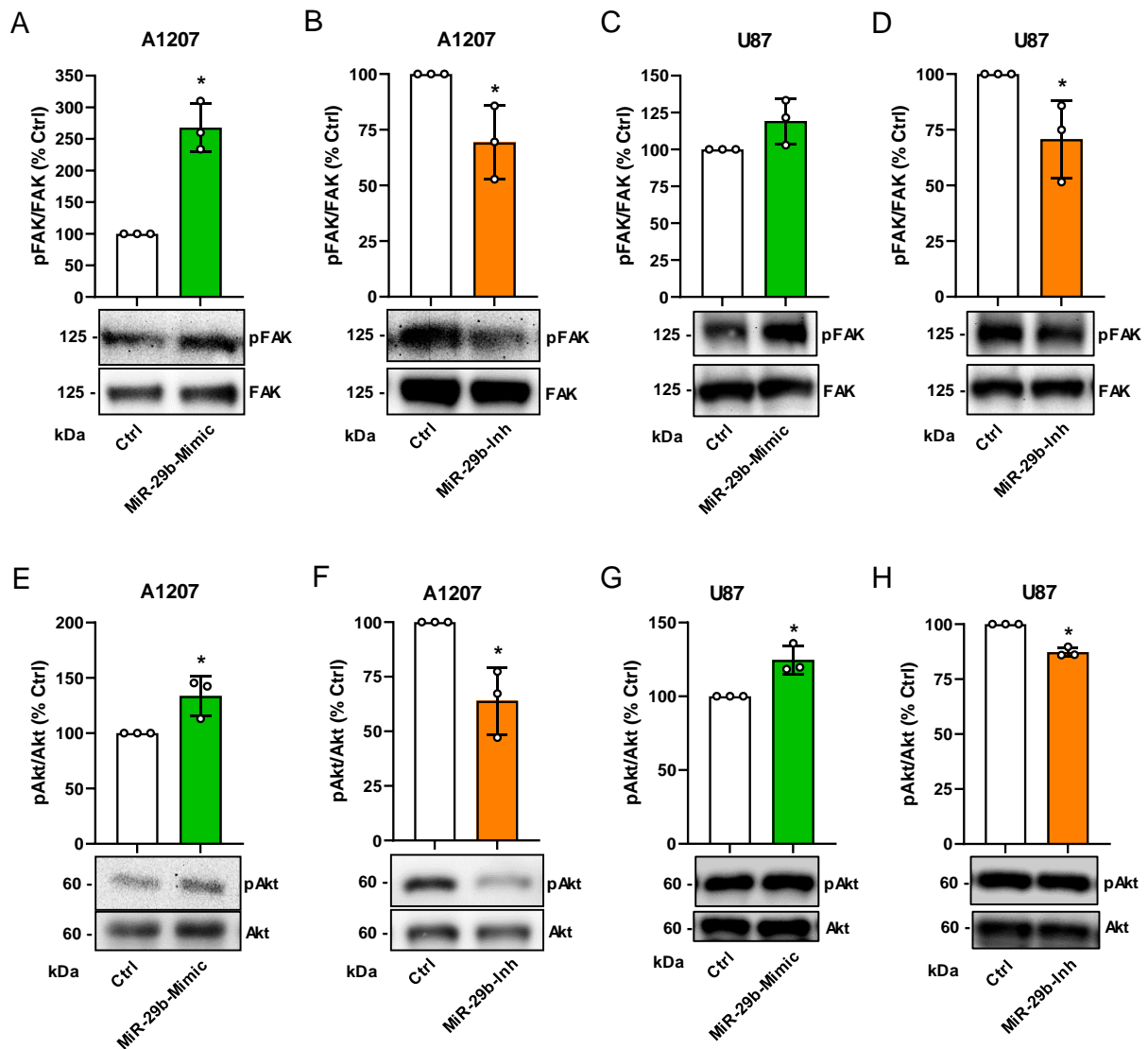


Abbildung 27: MiR-29b erhöht die Phosphorylierung von AKT und FAK in humanen GBM-Zellen. (A-H) A1207- und U87-Zellen wurden mit Ctrl (50 nM; weiß) und miR-29b-Mimic (50 nM; grün) oder mit Ctrl (100 nM; weiß) und miR-29b-Inh (100 nM; orange) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, Zellextrakte generiert und der Proteingehalt von pFAK^{Y397}, FAK, pAKT^{S473} und AKT mittels Western Blot bestimmt. Quantitative Analyse der Expression von pFAK (A-D) normiert auf FAK und pAKT (E-H) normiert auf AKT (in % zur Ctrl). MW \pm SD. *P < 0,05 vs. Ctrl (n = 3).

Die Transfektion der A1207- und U87-Zellen mit der miR-29b-Mimic erhöhte den prozentualen Anteil der AKT-Phosphorylierung an S473 und der FAK-Phosphorylierung an Y397 (Abbildung 27A, C, E und G). Dagegen bewirkte die Transfektion mit dem miR-29b-Inh in beiden Zelllinien eine Reduktion der Phosphorylierungen (Abbildung 27B, D, F und H).

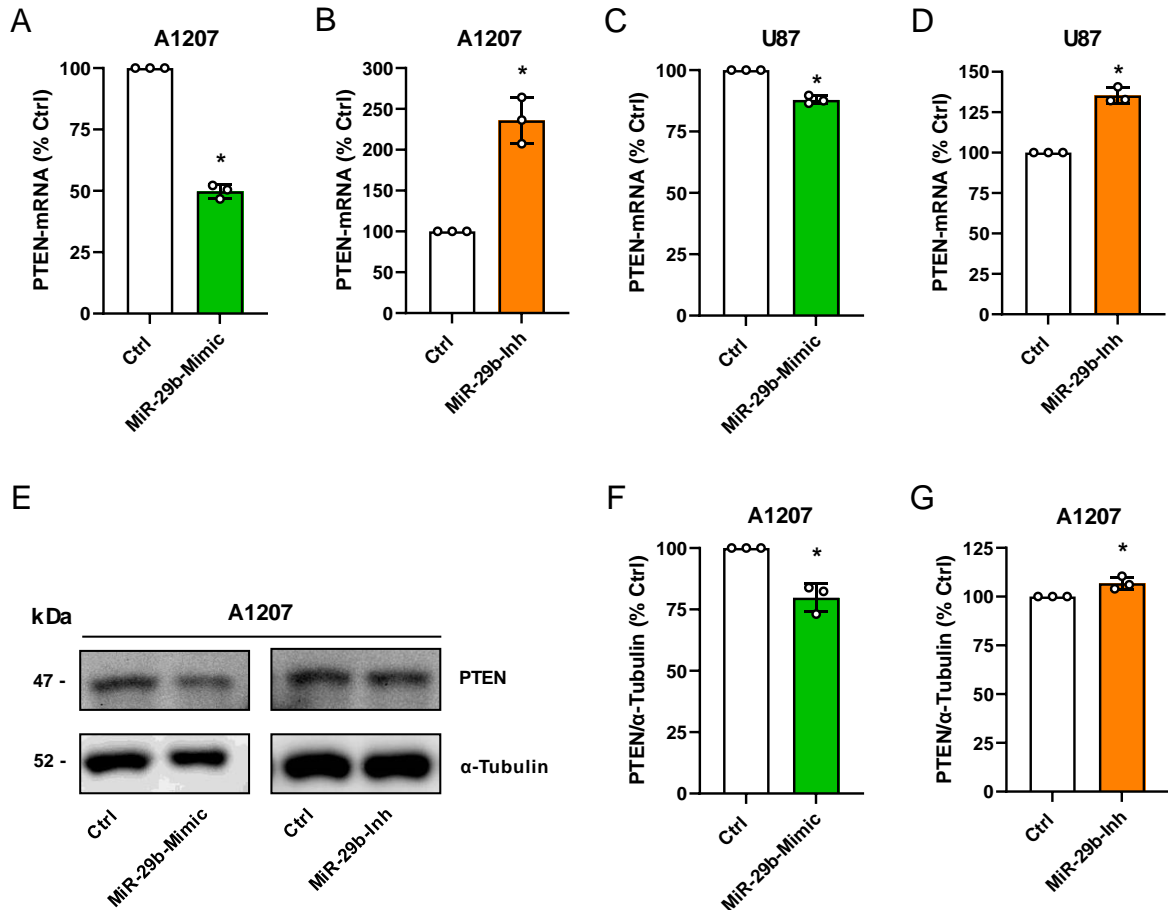


Abbildung 28: MiR-29b reduziert die PTEN-Expression in humanen A1207- und U87-Zellen. (A-D) A1207- und U87-Zellen wurden mit Ctrl (100 nM; weiß) und miR-29b-Mimic (100 nM; grün; A und C) oder mit Ctrl und miR-29b-Inh (100 nM; orange; B und D) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und der mRNA-Gehalt von PTEN und GAPDH (Ladekontrolle) mittels qPCR bestimmt. Quantitative Analyse des mRNA-Gehalts von PTEN normiert auf GAPDH (in % zur Ctrl). MW ± SD. *P < 0,05 vs. Ctrl (n = 3). (E-G) A1207-Zellen wurden wie in (A-D) beschrieben transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, Zellextrakte generiert und der Proteingehalt von PTEN und α-Tubulin mittels Western Blot bestimmt (E). Quantitative Analyse der Expression von PTEN (F und G) normiert auf α-Tubulin (in % zur Ctrl). MW ± SD. *P < 0,05 vs. Ctrl (n = 3).

Die Western Blot-Analysen zeigten nach miR-29b-Mimic-Transfektion nicht wie erwartet eine Reduktion der Phosphorylierung von AKT^{S437} und FAK^{Y397}. Ähnliche Effekte wurden in der Studie von Xia et al. [189] beobachtet. Dort führte die miR-29b-Mimic-Transfektion in adipösen mesenchymalen Stammzellen ebenfalls zu einer Erhöhung der AKT^{S437}-Phosphorylierung. Diese Ergebnisse wurden in der Studie auf eine miR-29b-abhängige Reduktion der PTEN-Expression zurückgeführt [189]. Die Phosphatase PTEN ist der Antagonist der PI3K, katalysiert die Dephosphorylierung von Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat (PIP3) zu Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat (PIP2) und dephosphoryliert zusätzlich die FAK an Y397 [190-193]. Mehrere Studien zeigten bereits, dass eine miRNA-abhängige Reduktion von

PTEN die aktivierende Phosphorylierung von FAK sowie AKT erhöht [194-196]. Ob auch in GBM-Zellen die PTEN-Expression durch die miR-29b beeinflusst wird, wurde mittels qPCR- und Western Blot-Analysen untersucht. Die Transfektion von A1207- und U87-Zellen mit miR-29b-Mimic führte zu einem reduzierten PTEN-mRNA-Gehalt (*Abbildung 28A und C*). Dagegen zeigten miR-29b-Inh-transfizierte Zellen eine Erhöhung des PTEN-mRNA-Gehalts (*Abbildung 28B und D*). In A1207-Zellen wurde auf Proteinebene der gleiche Effekt detektiert (*Abbildung 28E-G*).

Neben den Western Blot-Analysen von AKT und FAK wurde zusätzlich der proliferative ERK1/2-Signalweg analysiert. Dieser wird durch die Interaktion von NG2 mit Integrin $\beta 1$ und PDGFR α aktiviert [10, 188, 197]. Hierfür wurde erneut der Einfluss der miR-29b in A1207- und U87-Zellen mittels Western Blot-Analysen untersucht. Die quantitativen Auswertungen von mit miR-29b-Mimic und miR-29b-Inh transfizierten A1207- und U87-Zellen zeigte, dass die miR-29b-Mimic die aktivierende ERK1/2-Phosphorylierung reduziert und miR-29b-Inh die ERK1/2-Phosphorylierung erhöht (*Abbildung 29A-D*).

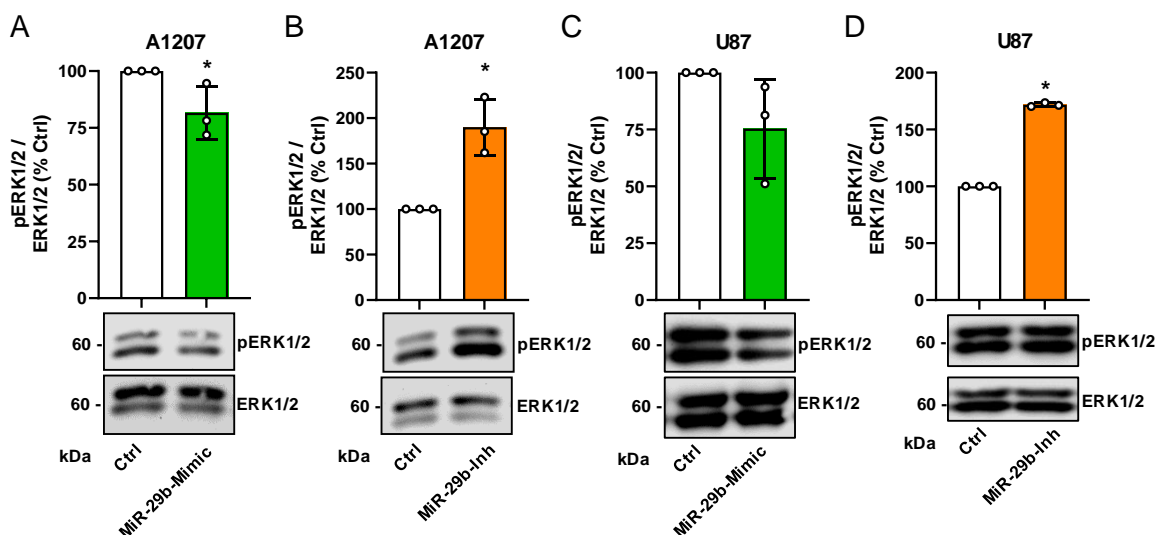


Abbildung 29: MiR-29b beeinflusst die Phosphorylierung von ERK in humanen A1207- und U87-Zellen. (A) A1207- und U87-Zellen wurden mit Ctrl (50 nM; weiß) oder miR-29b-Mimic (50 nM; grün) und mit Ctrl (100 nM; weiß) oder miR-29b-Inh (100 nM; orange) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, Zellextrakte generiert und der Proteingehalt von pERK1/2 und ERK1/2 (Ladekontrolle) mittels Western Blot bestimmt. Quantitative Analyse der Expression von pERK1/2 normiert auf ERK (in % zur Ctrl). MW \pm SD. *P < 0,05 vs. Ctrl (n = 3).

6.2.10 MiR-29b reduziert die Proliferation und Migration von humanen GBM-Zellen

In den vorherigen Abschnitten wurde gezeigt, dass die miR-29b die Expression von NG2, PDGFR α , PDGFR β und Integrin $\beta 1$ in GBM-Zellen reguliert und so Einfluss auf proliferative Signalkaskaden nimmt. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Effekte in verschiedenen funktionellen Untersuchungen zu verifizieren. Dazu wurden A1207- und U87-Zellen für 48 h mit miR-29b-Mimic bzw. miR-29b-Inh transfiziert und die metabolische Aktivität, als Indikator der Zellproliferation, in einem WST-1-Assay untersucht.

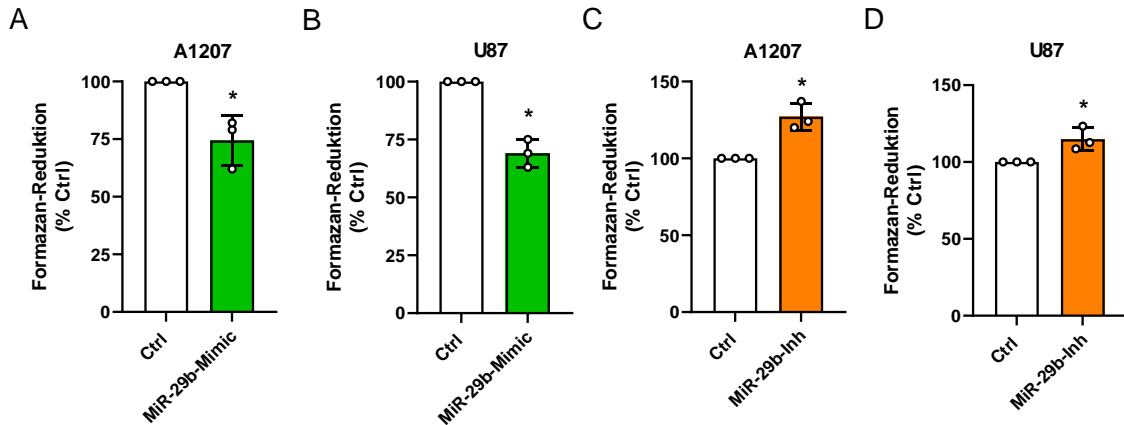


Abbildung 30: MiR-29b reduziert die metabolische Aktivität von humanen GBM-Zellen. (A-D) A1207- und U87-Zellen wurden mit Ctrl (50 nM; weiß) oder miR-29b-Mimic (50 nM; grün) und mit Ctrl (100 nM; weiß) oder miR-29b-Inh (100 nM; orange) transfiziert. Nach 48 h wurde die Formazan-Reduktion mittels WST-1-Assay bestimmt (in % zu Ctrl). MW ± SD. *P < 0,05 vs. Ctrl (n = 3).

Die miR-29b-Mimic verringerte die metabolische Aktivität in den A1207- und U87-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (*Abbildung 30A und B*). Der miR-29b-Inh zeigte den gegenteiligen Effekt und erhöhte die metabolische Aktivität (*Abbildung 30C und D*).

Der Einfluss der miR-29b auf die Zellmigration von A1207- und U87-Zellen wurde mithilfe eines Transwell-Assays untersucht (*Abbildung 31*).

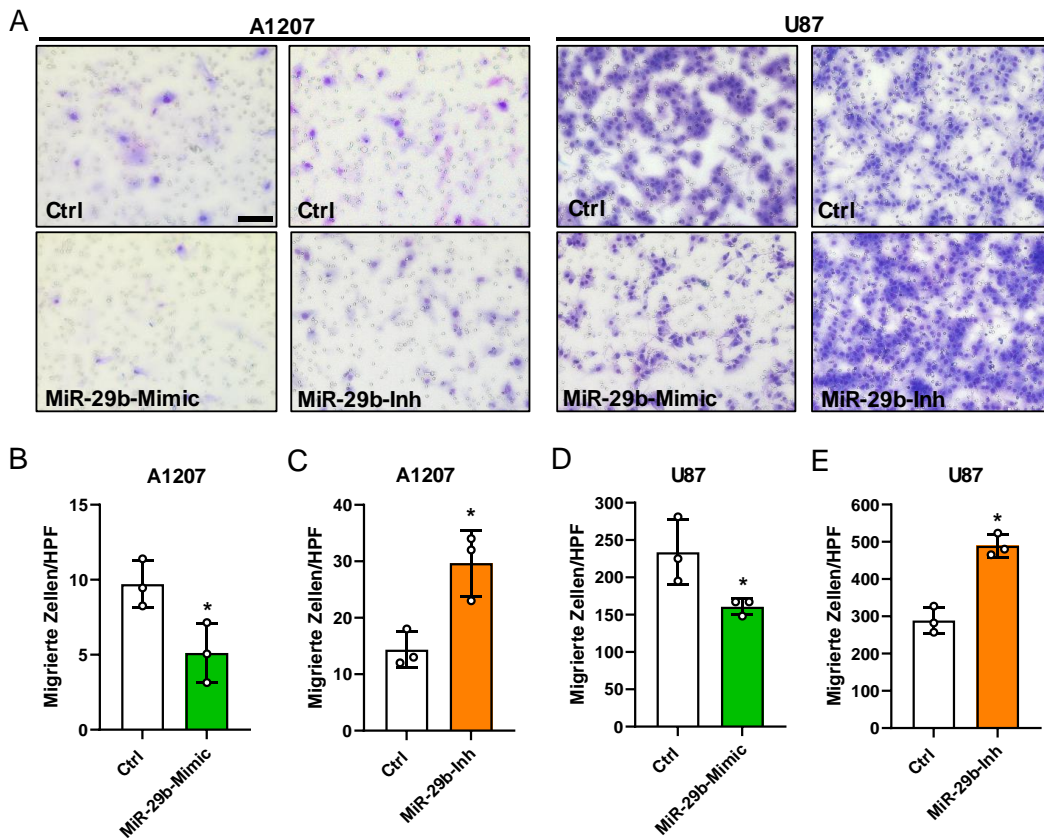


Abbildung 31: MiR-29b reduziert die Zellmigration von A1207- und U87-Zellen. (A) A1207- und U87-Zellen wurden mit Ctrl (50 nM; weiß) oder miR-29b-Mimic (50 nM; grün) und mit Ctrl (100 nM; weiß) oder miR-29b-Inh (100 nM; orange) transfiziert. Nach 48 h wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen auf einem Polycarbonat-Membraneinsatz ausgesät und in einem Transwell-Assay analysiert. Nach 5 h wurden die Membranen fixiert, gefärbt und die migrierten Zellen lichtmikroskopisch dokumentiert (Maßstab: 100 µm). (B-E) Quantitative Analyse der Anzahl an migrierten Zellen pro Hauptgesichtsfeld (HPF) nach 5 h. MW ± SD. *P < 0,05 vs. Ctrl (n = 3).

Für das Transwell-Assay wurden miR-29b-Mimic- bzw. miR-29b-Inh-transfizierte A1207- und U87-Zellen auf einem Polycarbonat-Membraneinsatz ausgesät und die Migration durch einen chemotaktischen Reiz angeregt. Sowohl die Anzahl der migrierten A1207-Zellen als auch der U87-Zellen wurde durch die miR-29b-Mimic reduziert (Abbildung 31A, B und D). Die Transfektion mit dem miR-29b-Inh erhöhte dagegen die Anzahl der migrierten Zellen (Abbildung 31A, C und E).

Zusätzlich wurde der Einfluss der miR-29b auf die Zellmigration von A1207-Zellen mittels eines *scratch*-Assays untersucht. Dafür wurden miR-29b-Mimic- bzw. miR-29b-Inh- und Ctrl-transfizierte A1207-Zellen bis zum Erreichen eines konfluenten Zellrasens kultiviert und anschließend eine Furche durch den Zellrasen gezogen und das Verschließen der Spaltfläche über einen Zeitraum von 24 h dokumentiert. Die miR-29b-Mimic-transfizierten Zellen zeigten nach 16 h eine größere freie Spaltfläche als die Ctrl-transfizierten Zellen (Abbildung 32A und B). Im Gegensatz dazu beschleunigte der miR-29b-Inh das Verschließen des Spaltes innerhalb von 16 h (Abbildung 32A und C). Nach 24 h wurde sowohl für die miR-29b-Mimic als auch für den miR-29b-Inh kein signifikanter Unterschied zur Ctrl detektiert (Abbildung 32B und C).

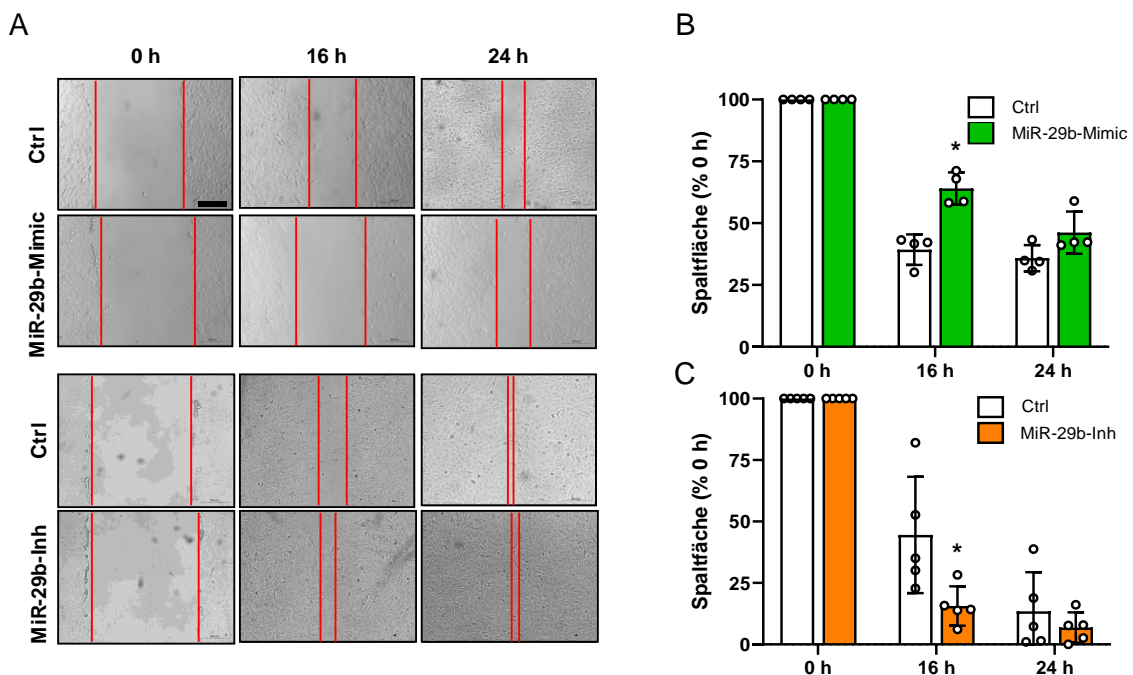


Abbildung 32: MiR-29b reduziert die Zellproliferation von humanen A1207-Zellen. (A) A1207-Zellen wurden mit Ctrl (50 nM; weiß) und miR-29b-Mimic (50 nM; grün) oder mit Ctrl (100 nM; weiß) und miR-29b-Inh (100 nM; orange) transfiziert und nach 48 h in einem *scratch*-Assay analysiert. 0 h, 16 h und 24 h nach Generierung des zellfreien Spalts wurde die Spaltfläche lichtmikroskopisch dokumentiert (Maßstab: 200 µM). (B und C) Quantitative Analyse der Spaltfläche von A1207-Zellen transfiziert mit Ctrl und miR-29b-Mimic oder Ctrl und miR-29b-Inh nach 0 h, 16 h und 24 h (in % zu 0 h). MW ± SD. *P < 0,05 vs. 0 h (n = 4-5).

Außerdem wurde der Einfluss der miR-29b auf die Aussprossung von A1207-Sphäroiden untersucht. Dafür wurden aus miR-29b-Mimic- und miR-29b-Inh-transfizierten A1207-Zellen Sphäroide generiert, diese in einer Kollagen-Matrix eingebettet und die Sprossungsfläche

nach 48 h gemessen (*Abbildung 33A*). Die Auswertung ergab eine reduzierte Aussprossung der miR-29b-Mimic-Sphäroide im Vergleich zu den Ctrl-Sphäroiden (*Abbildung 33B*). Dagegen zeigten die miR-29b-Inh-Sphäroide eine deutlich größere Sprossungsfläche (*Abbildung 33C*).

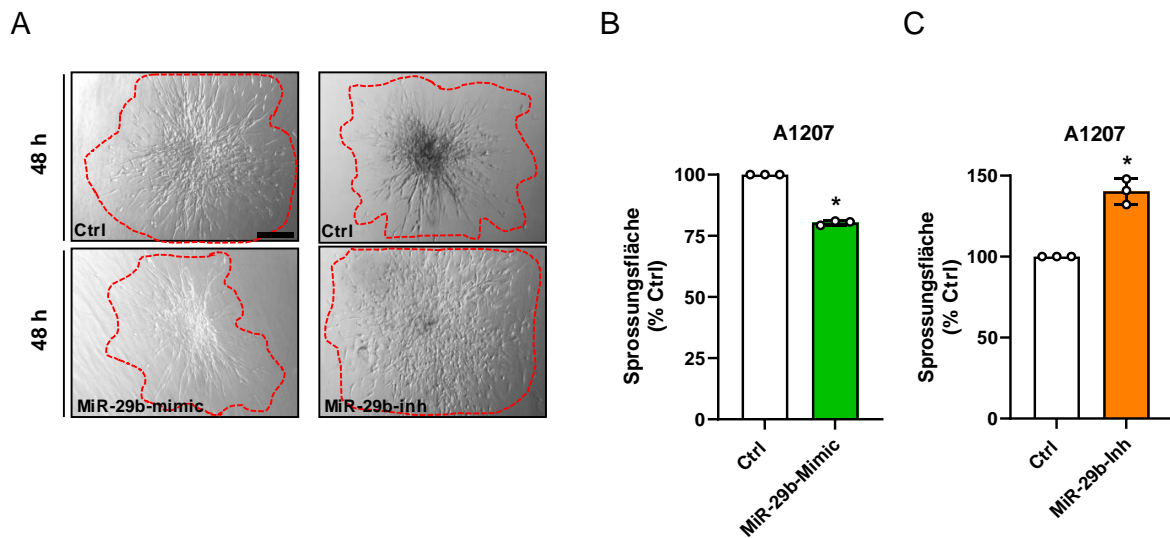


Abbildung 33: MiR-29b reduziert das Aussprossen von humanen A1207-Sphäroiden. (A) A1207-Zellen wurden mit Ctrl (100 nM; weiß) und miR-29b-Mimic (100 nM; grün) oder mit Ctrl (100 nM; weiß) und miR-29b-Inh (100 nM; orange) transfiziert. Nach 48 h wurden aus den transfizierten A1207-Zellen Sphäroide generiert. Nach 24 h wurden die Sphäroide in einer Kollagenmatrix eingebettet und für 48 h inkubiert. Die Sprossungsfläche (rot gestrichelte Linie) der A1207-Sphäroide wurde lichtmikroskopisch detektiert (Maßstab: 100 µm). (B und C) Quantitative Analyse der Sprossungsfläche der miR-29b-Mimic-transfizierten Sphäroide (B) und der miR-29b-Inh-transfizierten Sphäroide (C) (in % zur Ctrl). MW ± SD. *P < 0,05 vs. Ctrl (n = 3).

Allerdings ist zu beachten, dass die miR-29b noch über andere Zielmoleküle die hier beobachteten anti-proliferativen und anti-migratorischen Effekte auslösen könnte [107, 155]. Um den wichtigen Einfluss der NG2-Signaltransduktion auf die Zellproliferation und Zellmigration zu verdeutlichen, wurde zusätzlich der Einfluss der miR-29b in einer GBM-Zelllinie analysiert, welche NG2 im geringem Maß exprimiert. Zunächst wurde dafür mittels durchflusszytometrischer Analysen die NG2-Expression in den GBM-Zelllinien M059K, A1207 und U87 und der HEK293-Zelllinie analysiert. Im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle exprimierte die gesamte A1207- und U87-Zellpopulation das Oberflächenprotein NG2 (*Abbildung 34A*). Die HEK293-Zellen zeigten vereinzelt NG2-exprimierende Zellen (*Abbildung 34A*). Bei der GBM-Zelllinie M059K wurde eine NG2-exprimierende Subpopulation detektiert, jedoch war die Mehrheit der Zellen NG2-negativ (*Abbildung 34A*). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die GBM-Zelllinien A1207 und U87 als NG2-high und die GBM-Zelllinie M059K sowie die HEK293-Zellen als NG2-low eingeordnet. Die anti-migratorischen Effekte der miR-29b in den NG2-low M059K-Zellen wurde mittels eines Transwell-Assays untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass in den M059K-Zellen die miR-29b nur einen geringen und nicht signifikant anti-migratorischen Effekt induziert (*Abbildung 34B und C*).

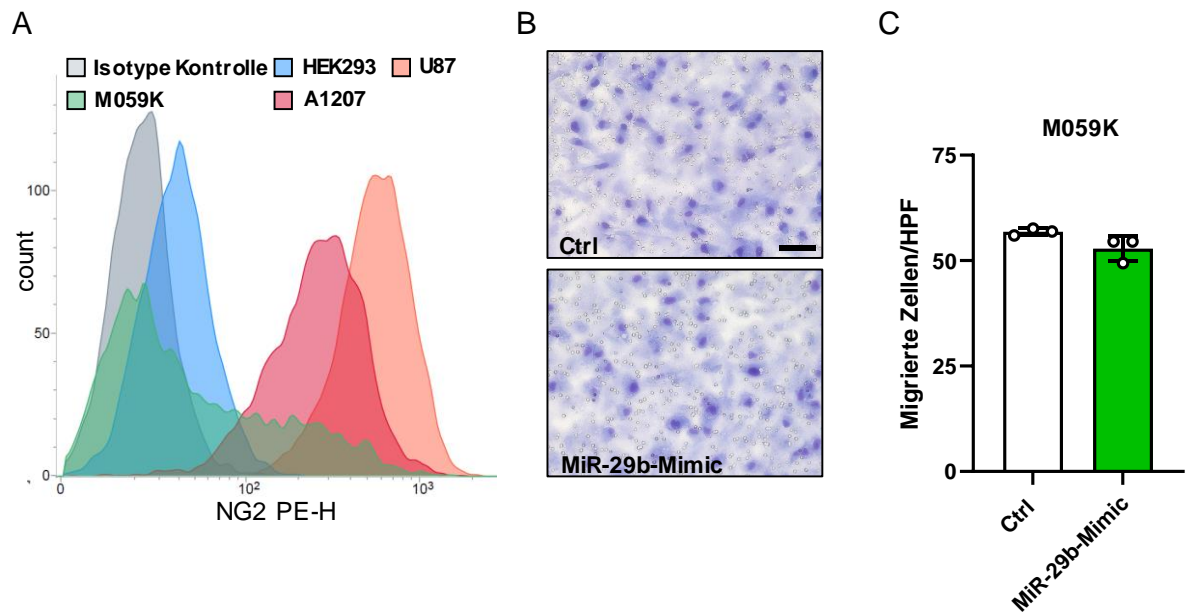


Abbildung 34: Der Einfluss der miR-29b auf die Zellmigration von M059K-Zellen. (A) A1207 (rot)-, U87 (orange)-, M059K (grün)- und HEK293 (blau)-Zellen wurden geerntet und mit einem PE-konjugierten anti-NG2-Antikörper oder einem PE-konjugierten anti-Maus IgG2 α , κ Antikörper (Isotyp-Kontrolle; grau) gefärbt. Der Proteingehalt von NG2 auf der Zelloberfläche wurde durchflusszytometrisch analysiert und in einem Histogramm dargestellt. (B) M059K-Zellen wurden mit Ctrl (50 nM; weiß) oder miR-29b-Mimic (50 nM; grün) transfiziert. Nach 48 h wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen auf einem Polycarbonat-Membraneinsatz ausgesät und in einem Transwell-Assay analysiert. Nach 5 h wurden die Membranen fixiert, gefärbt und die migrierten Zellen lichtmikroskopisch dokumentiert (Maßstab: 100 μ m). (C) Quantitative Analyse der Anzahl an migrierten Zellen pro Hauptgesichtsfeld (HPF) nach 5 h. MW \pm SD (n = 3).

6.2.11 Long non-coding (lnc)RNA H19 reduziert die miR-29b-Expression

Neben den regulatorischen Funktionen der miR-29b wurde zusätzlich auch die Regulierung der miR-29b im GBM analysiert. Auf posttranskriptioneller Ebene wirkt die miR-29b nicht nur selbst inhibitorisch, sondern ihre Funktion wird ebenfalls durch RNA-Moleküle inhibiert. Tang et al. [198] zeigten, dass die funktionelle Wirkung der miR-29b posttranskriptionell durch die direkte Bindung der lncRNA H19 (H19) inhibiert wird. Diese Tatsache ist besonders im Hinblick auf das GBM interessant, da die H19 im GBM mit einer onkogenen Funktion assoziiert ist [199-201]. Daher sollte im nächsten Abschnitt dieser Arbeit der Einfluss der H19 auf die miR-29b-Expression im GBM untersucht werden. Zunächst wurde die Expression von H19 mithilfe von zwei TCGA-Datensätzen (Firehose Legacy: Brain Lower Grade Glioma und Cell 2013: Glioblastoma) in Gliomen mit WHO-Grad I bis IV analysiert [178-180]. Diese Expressionsanalysen ergaben eine signifikant erhöhte Expression der lncRNA H19 im hochgradigen GBM im Vergleich zu den niedriggradigen Gliomen AC, ODG und AAC (Abbildung 35A). Zusätzlich ergab sich eine mittlere positive Spearman-Korrelation ($r = 0,46$) zwischen der H19- und NG2-Expression im GBM (Abbildung 35B).

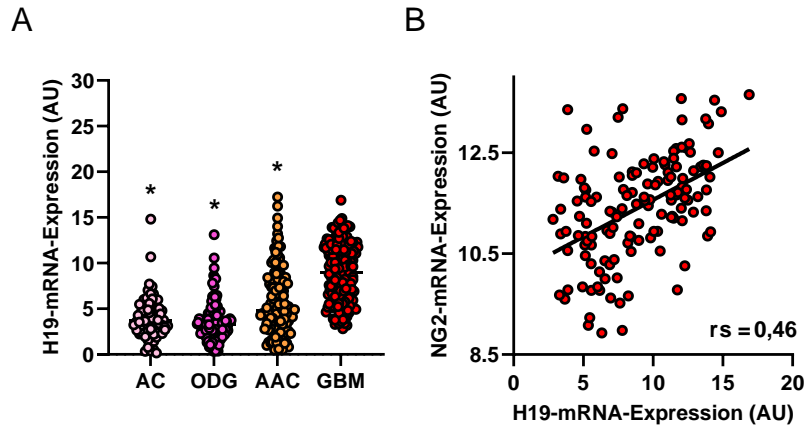


Abbildung 35: NG2 und miR-29b Expression in humanen Gliomen. (A) Die relative H19 mRNA-Expression (TCGA-basierte Datensätze (Firehose Legacy: Brain Lower Grade Glioma und Cell 2013: Glioblastoma) der cBioPortal Plattform; arbitrary units (AU)) wurde in Gewebeproben aus humanen Astrozytomen (AC; WHO-Grad II-IV; n = 67), Oligodendrogliomen (ODG; WHO-Grad II/III; n = 120), anaplastischen Astrozytomen (AAC; WHO-Grad III n = 130) und GBM (WHO-Grad IV; n = 152) analysiert. *P < 0,05 vs. GBM. (B) Spearman-Korrelation zwischen der H19- und NG2-Expression (TCGA-basierter Datensatz (Cell 2013: Glioblastoma) der cBioPortal Plattform; arbitrary units (AU)). Spearman-Korrelationskoeffizient $r = 0,46$, $p < 0,0001$ (n = 136).

Die H19-Expression wurde in HEK293-, U87- und A1207-Zellen mittels qPCR-Analysen untersucht. Die U87- und A1207-Zellen zeigten im Vergleich zu HEK293-Zellen eine erhöhte H19-Expression, wobei die U87-Zellen eine höhere H19-Expression aufwiesen als die A1207-Zellen (Abbildung 36A). Für die Analyse des Einflusses der H19 auf die miR-29b-Expression wurde diese in A1207- und U87-Zellen überexprimiert und der miR-29b-mRNA-Gehalt in qPCR-Analysen untersucht. In beiden Zelllinien reduzierte die H19-Überexpression den miR-29b-mRNA-Gehalt deutlich (Abbildung 36B und C).

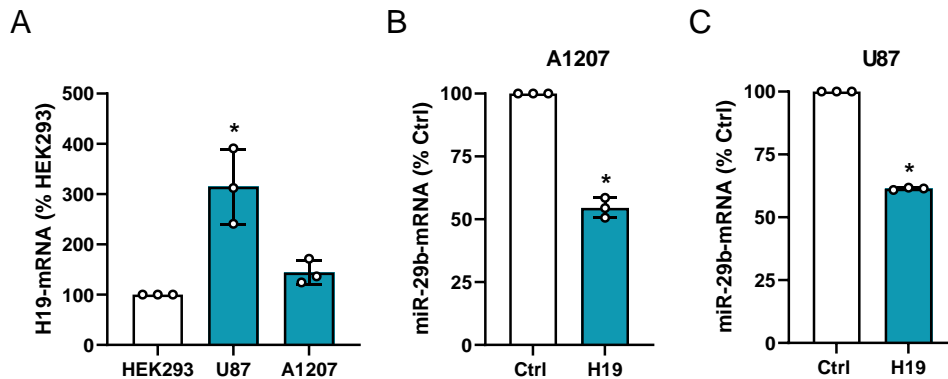


Abbildung 36: LncRNA H19 reduziert die miR-29b-Expression in A1207- und U87-Zellen. (A) HEK293-Zellen (Negativkontrolle), U87- und A1207-Zellen wurden geerntet, die RNA isoliert und der mRNA-Gehalt von H19 und GAPDH (Ladekontrolle) mittels qPCR bestimmt. Quantitative Analyse des mRNA-Gehalts von H19 normiert auf GAPDH (in % zu HEK293). MW \pm SD. *P < 0,05 vs. HEK293 (n = 3). (B und C) A1207- und U87-Zellen wurden mit Ctrl (250 ng; weiß) und H19 (250 ng; blau) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und der mRNA-Gehalt von miR-29b und RNU6 (Ladekontrolle) mittels qPCR bestimmt. Quantitative Analyse des mRNA-Gehalts von miR-29b normiert auf RNU6 (in % zur Ctrl). MW \pm SD. *P < 0,05 vs. Ctrl (n = 3).

Des Weiteren wurde untersucht, ob die H19-vermittelte Reduktion der miR-29b-Expression die NG2-Expression beeinflusst. Hierfür wurden A1207- und U87-Zellen mit H19 transfiziert und der NG2-Proteingehalt auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch detektiert. Sowohl in den A1207-Zellen als auch in den U87-Zellen führte die H19-Überexpression zu einer Erhöhung

des NG2-Proteingehalts (*Abbildung 37A und B*). Außerdem wurde mittels qPCR-Analysen in A1207-Zellen nach H19-Überexpression ein erhöhter NG2-mRNA-Gehalt detektiert (*Abbildung 37C*).

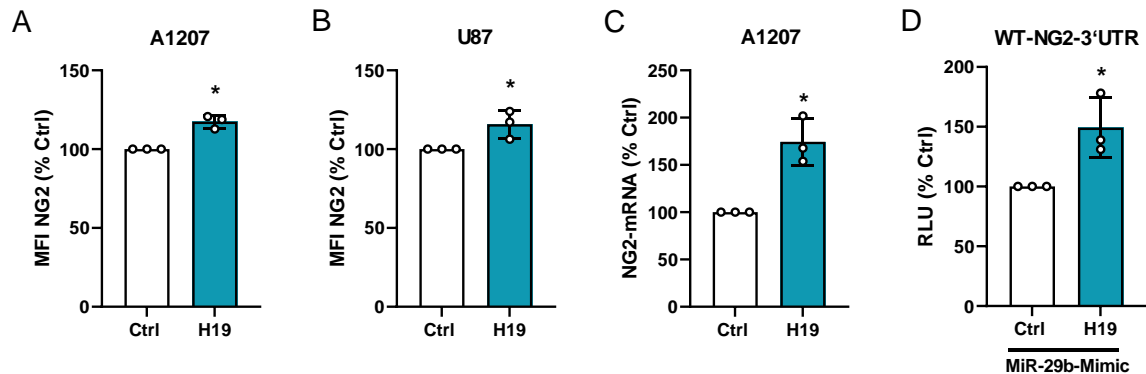


Abbildung 37: LncRNA H19 erhöht die NG2-Expression in A1207- und U87-Zellen. (A und B) A1207- (A) und U87-Zellen (B) wurden mit Ctrl (250 ng; weiß) und H19 (250 ng; blau) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, mit einem PE-konjugierten anti-NG2-Antikörper gefärbt und der Proteingehalt von NG2 auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch analysiert. MW ± SD. *P < 0,05 vs. Ctrl (n = 3). (C) A1207-Zellen wurden mit Ctrl (250 ng; weiß) und H19 (250 ng; blau) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und der mRNA-Gehalt von NG2 und GAPDH (Ladekontrolle) mittels qPCR bestimmt. Quantitative Analyse des mRNA-Gehalts von NG2 normiert auf GAPDH (in % zur Ctrl). MW ± SD. *P < 0,05 vs. Ctrl (n = 3). (D) HEK293-Zellen wurden mit WT-NG2-3'-UTR (250 ng), miR-29b-Mimic (100 nM) und Ctrl (250 ng; weiß) oder H19 (250 ng; blau) cotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und die relative Lichteinheit (RLU) mittels eines Luciferase-Assays bestimmt. MW ± SD. *P < 0,05 vs. Ctrl (n = 3).

Zusätzlich sollte über Reporteranalysen untersucht werden, ob die H19-abhängige miR-29b-Inhibition die NG2-Expression indirekt beeinflusst. Dafür wurden HEK293-Zellen mit dem Reportergenkonstrukt WT-NG2-3'-UTR, der miR-29b-Mimic und Ctrl oder H19 cotransfiziert und in einem Luciferase-Assay die Aktivität der NG2-3'-UTR untersucht. Die Reporteranalysen ergaben eine erhöhte Luciferase-Aktivität der NG2-3'-UTR nach einer miR-29b-Mimic und H19 Cotransfektion (*Abbildung 37D*). Dies weist auf eine Inhibition der miR-29b durch die H19 hin, was wiederum Einfluss auf die Regulation der NG2-3'-UTR durch die miR-29b nimmt.

6.2.12 C-Myc erhöht über H19 und miR-29b die NG2-Expression

Zusätzlich zu H19 könnte der Transkriptionsfaktor c-Myc eine Rolle in der miR-29b-Regulation spielen, denn das Proto-Onkogen c-Myc wirkt als Aktivator der H19-Transkription und dessen Expression korreliert positiv mit dem Malignitätsgrad von Gliomen [202-205]. Aus diesem Grund sollte analysiert werden, ob c-Myc als Aktivator der H19-Expression über miR-29b die NG2-Expression beeinflusst. Dafür wurde zunächst die c-Myc-Expression in HEK293-, U87- und A1207-Zellen mittels Western Blot- und qPCR-Analysen untersucht. Die NG2-positiven U87- und A1207-Zellen zeigten eine stärkere c-Myc-Expression im Vergleich zu den HEK293-Zellen (*Abbildung 38A*). Eine höhere c-Myc-Expression in den GBM-Zellen wurde ebenfalls auf mRNA-Ebene mithilfe einer qPCR-Analyse nachgewiesen (*Abbildung 38B*).

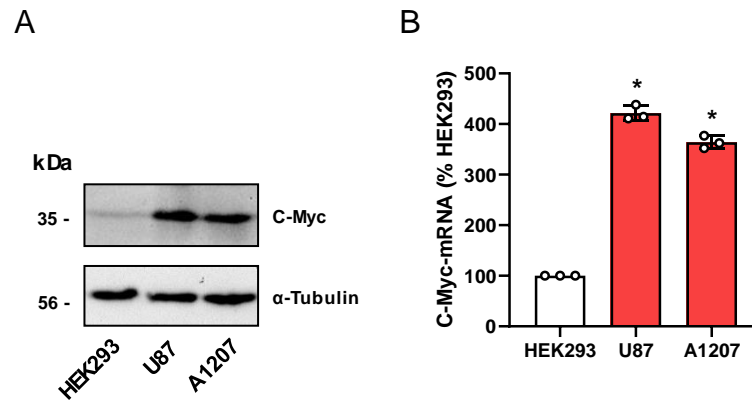


Abbildung 38: c-Myc-Expression in humanen A1207- und U87-Zellen. (A) HEK293-Zellen, U87-Zellen und A1207-Zellen wurden geerntet, Zellextrakte generiert und der Proteingehalt von c-Myc und α -Tubulin (Ladekontrolle) mittels Western Blot bestimmt. (B) HEK293-Zellen (Negativkontrolle), U87-Zellen und A1207-Zellen wurden geerntet, die RNA isoliert und der mRNA-Gehalt von c-Myc und GAPDH (Ladekontrolle) mittels qPCR bestimmt. Quantitative Analyse des mRNA-Gehalts von c-Myc normiert auf GAPDH (in % zu HEK293). MW \pm SD. *P < 0,05 vs. HEK293 (n = 3).

Der indirekte Einfluss von c-Myc über H19 und miR-29b auf die NG2-Expression wurde durchflusszytometrisch analysiert. Die c-Myc-transfizierten A1207- und U87-Zellen zeigten eine verstärkte NG2-Expression auf der Zelloberfläche, wobei nur für die U87-Zellen ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Ctrl detektiert wurde (Abbildung 39A und B). Jedoch wurde mittels qPCR-Analysen in c-Myc-transfizierten A1207-Zellen eine deutliche Erhöhung des NG2-mRNA-Gehalts detektiert (Abbildung 39C).

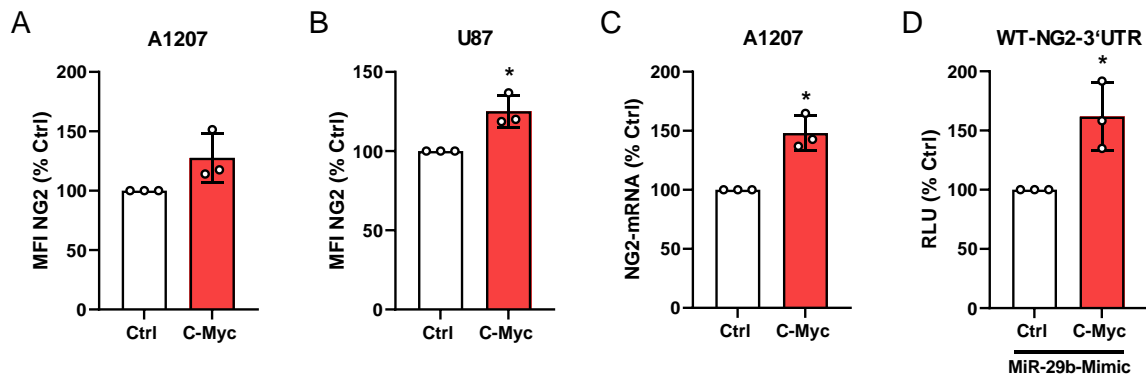


Abbildung 39: C-Myc erhöht die NG2-Expression in humanen A1207- und U87-Zellen. (A und B) A1207-Zellen (A) und U87-Zellen (B) wurden mit Ctrl (250 ng; weiß) und c-Myc (250 ng; rot) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, mit einem PE-konjugierten anti-NG2-Antikörper gefärbt und der Proteingehalt von NG2 auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch analysiert. MW \pm SD. *P < 0,05 vs. Ctrl (n = 3). (C) A1207-Zellen wurden wie in (A und B) beschrieben transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und der mRNA-Gehalt von NG2 und GAPDH (Ladekontrolle) mittels qPCR bestimmt. Quantitative Analyse des mRNA-Gehalts von NG2 normiert auf GAPDH (in % zur Ctrl). MW \pm SD. *P < 0,05 vs. Ctrl (n = 3). (D) HEK293-Zellen wurden mit WT-NG2-3'-UTR (250 ng), miR-29b-Mimic (50 nM) und Ctrl (250 ng; weiß) oder c-Myc (250 ng; rot) cotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und die relative Lichteinheit (RLU) mittels eines Luciferase-Assays bestimmt. MW \pm SD. *P < 0,05 vs. Ctrl (n = 3).

Auch hier sollte mithilfe einer Reporteranalyse der indirekte Einfluss von c-Myc auf die NG2-Genexpression untersucht werden. Dafür wurden HEK293-Zellen mit WT-NG2-3'UTR, miR-29b-Mimic und Ctrl oder c-Myc transfiziert und in einem Luciferase-Assay analysiert. Die c-Myc-Überexpression führte zu einer erhöhten Luciferase-Aktivität der NG2-3'-UTR im

Vergleich zur Ctrl (*Abbildung 39D*). Dies deutet daraufhin, dass c-Myc die Expression von H19 verstärkt und diese wiederum die miR-29b inhibiert, wodurch der Abbau der NG2-3'-UTR durch die miR-29b verhindert wird.

6.2.13 Die Expression von Transmembranproteinen beeinflusst den prognostischen Index in GBM-Subtypen

Aufgrund des heterogenen Phänotyps wird das GBM in die Subtypen Klassisch (KL), Mesenchymal (MES), Proneural (PN) und Neural (NE) unterteilt [206]. Dabei klassifizieren spezifische Expressionsveränderungen jeweils den CL-, MES- und PN-Subtyp [206]. Die Expression der in dieser Arbeit untersuchten Transmembranproteine NG2, PDGFR α , PDGFR β und Integrin β 1 fördern alle die GBM-Tumorprogression. Daher sollte in einer letzten Analyse die Expression dieser Proteine mit der Überlebenszeit von GBM-Patienten korreliert werden. Hierbei ermöglicht die Glioma Bio Discovery Portal (Glioma-BioDP) Software die ausführliche Analyse von Gliom-Datensätzen des TCGAs [207, 208] (<https://glioma-biodp.nci.nih.gov>). Mittels des multidimensionalen prognostischen Index wurde der Zusammenhang der Expression von NG2, PDGFRA, PDGFRB und ITGB1 mit der Überlebenszeit in den GBM-Subtypen analysiert. Die berechneten Kaplan-Meier-Kurven zeigten, dass die Überlebenszeit des CL-Subtyps nicht durch die zuvor genannten Transmembranproteine beeinflusst wird (*Abbildung 40A*). Dagegen ist die Überlebenszeit der Patienten mit den MES- und NE-Subtypen signifikant verkürzt (*Abbildung 40B und D*). Im PN-Subtyp war lediglich eine Tendenz zur erniedrigten Überlebenszeit bei einer verstärkten Expression von NG2, PDGFRA, PDGFRB und ITGB1 zu detektieren (*Abbildung 40C*).

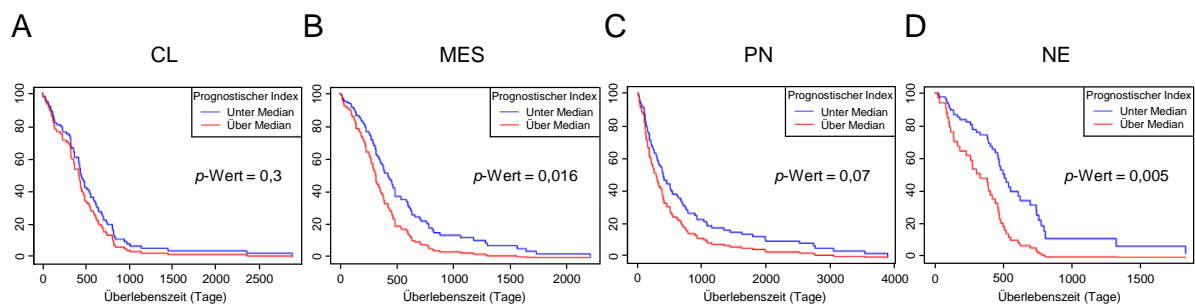


Abbildung 40: Einfluss von NG2, PDGFR α , PDGFR β und Integrin β 1 auf die Überlebenszeit von GBM-Patienten. (A-D) Die relative Expression von NG2, PDGFRA, PDGFRB und ITGB1 (TCGA-basierte Datensätze der Glioma-BioDP Software) wurden mittels des multidimensionalen prognostischen Index in den GBM-Subtypen Klassisch (KL; n = 104), Mesenchymal (MES; n = 123), Proneural (PN; n = 112) und Neural (NE; n = 55) analysiert und die Überlebenszeit (in Tagen) in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt.

6.2.14 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion der miR-29b in GBM-Zellen untersucht. Dabei lag der Fokus auf einer miR-29b-vermittelten Regulation der NG2-Expression. In ersten molekularbiologischen Analysen wurde eine miR-29b-abhängige

Reduktion der NG2-Expression in GBM-Zellen detektiert. Hierbei konnte eine direkte Interaktion der miR-29b mit der NG2-3'-UTR mittels Reporteranalysen verifiziert werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die miR-29b über den Transfaktionsfaktor Sp1 die NG2-Expression indirekt reduziert. Neben der Regulation der NG2-Expression zeigten verschiedene molekulare Analysen, dass miR-29b auch die Expression der NG2-Interaktionspartner Integrin $\beta 1$, PDGFR α und PDGFR β posttranskriptionell reguliert. Weitere funktionelle *in vitro* Untersuchungen ergaben, dass die miR-29b-abhängige Regulation des NG2-Netzwerks die Proliferation und Migration von GBM-Zellen reduziert. Diese beobachteten Effekte wurden auf eine verringerte ERK1/2-Aktivität zurückgeführt. Schließlich wurde die Regulation der miR-29b-Expression analysiert und die beiden Onkogene lncRNA H19 und c-Myc als negative Regulatoren der miR-29b-Expression identifiziert.

7 Diskussion

Das Transmembranprotein NG2 hat ohne Interaktionspartner nur begrenzte Möglichkeiten, Signaltransduktionskaskaden zu regulieren [14, 19]. Allerdings leistet das Proteoglykan über die Interaktion mit Membranproteinen, wie Integrin $\beta 1$, der Rezeptorkinase PDGFR α und extrazellulären Matrixproteinen, wie Kollagen Typ V und VI, einen essenziellen Beitrag zur transmembranen Signaltransduktion, welche die Proliferation, Migration und Angiogenese beeinflusst [8, 15, 102, 173, 188, 197].

Die Aktivität von NG2 ist nicht nur durch Interaktionspartner reguliert, sondern seine Expression ist auch auf bestimmte Zelltypen limitiert, welche sich unter anderem durch eine hohe proliferative und angiogene Aktivität auszeichnen [5, 14, 22]. Aus diesem Grund wird NG2 auch als Marker für proliferierende Zellen, wie Perizyten sowie ektodermale und mesenchymale Vorläufer- und Progentiorzellen, beschrieben [32, 102]. In Anbetracht dieser Eigenschaften ist es nicht verwunderlich, dass eine verstärkte NG2-Expression im Melanom, GBM und Brustkrebs nicht nur die Tumorprogression begünstigt, sondern auch mit dem Malignitätsgrad positiv korreliert [14, 209-211].

7.1 Einfluss der CK2-Inhibition auf die NG2-Expression im JA

Zusätzlich zum Melanom, GBM und Brustkrebs könnte NG2 auch in der JA-Tumorprogression eine Bedeutung haben. Das benigne aber trotzdem aggressive und invasive JA-Tumorwachstum stellt eine Herausforderung für die Therapie dar, wobei die verantwortlichen molekularen Mechanismen noch nicht gut erforscht sind [76]. Vor ein paar Jahren wurde bereits eine verstärkte NG2-Expression im JA detektiert, jedoch wurde deren funktionelle Rolle nicht weiter analysiert [78].

In Anbetracht der zahlreichen Belege, dass NG2 in mehreren Tumoren verstärkt exprimiert wird, sowie dessen bedeutsame Funktion in der Tumorprogression, steht das Proteoglykan seit Jahren im Fokus der pharmakologischen Therapieentwicklung [14, 22, 30, 169, 212]. Jedoch erfüllt NG2 als Proteoglykan ohne aktives enzymatisches Zentrum nicht die Voraussetzungen für eine orthosterische pharmakologische Inhibition [213]. Daher fokussieren sich eine Vielzahl von Studien auf immuntherapeutische Ansätze, wie die Verwendung von monoklonalen Antikörpern (mAKs), antiidiotypischen Antikörpern, *bi-specific T-cell engagers* (BiTE-Antikörper) oder der Radioimmuntherapie [33, 214-222]. Der Einsatz von Immuntherapien hat zwar die Krebsbehandlung in den letzten Jahren revolutioniert, jedoch ist der Erfolg vom Immunstatus des Tumors abhängig. So ist dieser Therapieansatz in Tumoren mit lokaler und systemischer Immunsuppression, wie dem GBM, bis heute nur erschwert möglich [223-226]. Eine weitere Therapiemöglichkeit ist die indirekte Inhibierung der NG2-Expression über regulatorische Faktoren mittels pharmakologischer Hemmstoffe. Erst kürzlich

wurde gezeigt, dass die Proteinkinase CK2 die NG2-Genexpression in Perizyten reguliert [38]. Dabei resultierte die CK2-Inhibition in einer reduzierten Proliferation, Migration sowie Sprossungskapazität dieser vaskulären Zellen [38]. Ähnliche Ergebnisse wurden in NG2-positiven GBM-Zellen beobachtet. Dort resultierte die CK2-Inhibition in einer NG2-abhängigen Reduktion der Zellproliferation und Zellmigration [39]. Die beobachteten anti-angiogenen und anti-proliferativen Effekte einer CK2-Inhibition in Perizyten und NG2-positiven Tumorzellen legen nahe, dass ähnliche Resultate auch im vaskulären NG2-positiven JA zu erwarten sind. Ein zusätzlicher Vorteil der pharmakologischen Hemmung der CK2 ist das breite Spektrum an Inhibitoren, welche seit Jahrzehnten im Fokus der Arzneimittelforschung für Tumorerkrankungen stehen. Entsprechend befinden sich bereits zwei CK2-Inhibitoren, CX-4945 und CIGB-300, in klinischen Studien [42].

Basierend auf diesen Grundlagen sollte im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob eine CK2-Inhibition in JA-Zellen sowohl die NG2-Expression als auch funktionelle Prozesse wie Zellproliferation und Zellmigration reduziert. Die Expression der CK2 ist in einer Vielzahl von Pathologien dysreguliert, wobei der onkogene Einfluss der CK2 auf die *hallmarks of cancer* in vielen Tumorerkrankungen sehr gut untersucht ist [42]. Jedoch wurde die Expression der CK2 im JA noch nicht analysiert. Mit molekularbiologischen Methoden und immunhistochemischen Färbungen wurde in JA-Gewebeproben und in JA-Zellkulturen sowohl die Expression von NG2, CK2 α und CK2 β als auch die enzymatische Aktivität der CK2 nachgewiesen. Allerdings konnte keine Aussage über eine mögliche Dysregulation der NG2- und CK2-Expression im JA getroffen werden, da die JA-Ätiologie nicht vollständig geklärt ist und dementsprechend ein Referenzgewebe fehlte [76, 227].

Für die Inhibierung der CK2 wurden die zwei ATP-kompetitiven Hemmstoffe CX-4945 und SGC-CK2-1 verwendet. Der Hemmstoff CX-4945 ist der am häufigsten eingesetzte CK2-Inhibitor, welcher aufgrund seiner anti-proliferativen, anti-angiogenen und apoptotischen Effekte in verschiedenen Tumorzellen in mehreren klinischen Studien getestet wird [69, 72, 228, 229]. Obwohl CX-4945 eine hohe CK2-Bindungsaffinität besitzt, inhibiert dieser Hemmstoff insgesamt 28 Kinasen, wie *cdc2-like kinases* (Clks), *dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinases* (DYRKs) und *glycogen synthase kinase-3 beta* (GSK3 β), mit einer hohen Affinität [230-232]. Es fehlen trotz jahrelanger Forschung potente selektive CK2-Inhibitoren [72]. Für die Reduktion der Off-Target-Effekte wurde bereits die Selektivität des etablierten Hemmstoffes CX-4945 durch strukturelle Veränderungen optimiert [230]. Zusätzlich werden weiterhin neue CK2-Inhibitoren synthetisiert und analysiert. Erst kürzlich wurde der nicht-toxische CK2-Inhibitor SGC-CK2-1 (IC_{50} = 36 nM für CK2 α und IC_{50} = 16 nM für CK2 α') synthetisiert, welcher mit einer hohen Affinität die CK2 selektiver inhibiert als CX-4945 (IC_{50} = 45 nM für CK2 α') [72]. Die fortlaufenden Entwicklung von selektiveren Inhibitoren

ist ein wichtiger Schritt zur vollständigen Aufklärung des komplexen CK2-Netzwerkes, besonders im Hinblick auf einen möglichen pharmakologischen Therapieeinsatz [72, 233].

Der Einfluss der beiden Inhibitoren auf CK2-abhängige funktionelle Prozesse im JA wurde in der vorliegenden Arbeit in mehreren *in vitro* Untersuchungen in neu generierten JA-Zellkulturen analysiert. In den ersten Analysen wurde mittels einer Viabilitätsuntersuchung eine effektive anti-proliferative Wirkung der Inhibitoren CX-4945 und SGC-CK2-1 in JA-Zellen bei einer Konzentration von 10 μ M bzw. 5 μ M nachgewiesen. Diese Effekte konnten durch die Analyse der CK2-spezifischen Phosphorylierungsstelle an AKT^{S129} auf eine erfolgreiche enzymatische CK2-Inhibition zurückgeführt werden [65].

Die CK2 beeinflusst mit über 500 Substraten zwar mehrere Faktoren der Proliferation und Migration, jedoch konnten die anti-migratorischen Effekte nach CK2-Inhibition in NG2-positiven GBM-Zellen durch ein *rescue*-Experiment auch auf eine reduzierte NG2-Expression zurückgeführt werden [39, 41]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass die CK2-Inhibition mit CX-4945 und SGC-CK2-1 zu einer reprimierten NG2-Expression in den NG2-positiven JA-Zellen führt. Zusätzlich konnten Schmitt et al. [38] im Fall von CX-4945 durch einen siRNA-vermittelten Knockdown der CK2 α und CK2 α' Untereinheit zeigen, dass die NG2-Expression in Abhängigkeit der CK2 reduziert wird und es sich nicht um Inhibitor-spezifische Nebeneffekte handelt. Des Weiteren wurde bereits nachgewiesen, dass die CK2 die NG2-Expression transkriptionell reguliert und damit das Proteoglykan kein direktes Substrat der CK2 ist [38]. Auf Grundlage dieser Studien und der Ergebnisse dieser Arbeit kann im JA eine indirekte transkriptionelle Regulation der NG2-Expression durch die CK2 vermutet werden. Jedoch war die ausführliche Untersuchung der Regulation der NG2-Genexpression im JA kein Teil dieser Arbeit. So bleibt diese Vermutung eine Fragestellung für zukünftige Analysen. Darüber hinaus waren die Expressionen der CK2 α - und CK2 β -Untereinheiten von der CK2-Inhibition nicht betroffen. Dies lässt eine rein enzymatische CK2-Inhibition ohne negative Rückkopplung vermuten. Für eine Bestätigung dieser Vermutung, könnten in weiterführenden Untersuchungen zusätzlich CK2-Phosphorylierungs-Assays von CX-4945- und SGC-CK2-1-behandelten JA-Zellkulturen durchgeführt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die funktionellen Auswirkungen des reduzierten NG2-Proteingehalts in JA-Zellen infolge einer CK2-Inhibition zu untersuchen. Das durchgeführte BrdU-Proliferationsassay detektierte nach CK2-Inhibition sowohl mit CX-4945 als auch SGC-CK2-1 eine reduzierte Proliferation, wobei SGC-CK2-1 stärkere anti-proliferative Effekte zeigte. Zudem unterdrückten beide Hemmstoffe das Aussprossen von JA-Sphäroiden im *spheroid sprouting*-Assay. Diese Effekte können in Zusammenhang mit einer reduzierten NG2-Signaltransduktion nach CK2-Inhibition gebracht werden. Das Proteoglykan NG2 aktiviert durch die Interaktion mit Kollagen Typ VI und der anschließenden Aktivierung von AKT und β -Catenin die Proliferation in malignen duktalem Epithelzellen [234]. Außerdem

fördert die Interaktion mit Kollagen Typ VI das migratorische Potenzial von NG2-positiven Zellen [104]. Zusätzlich führt eine NG2-abhängige Integrin $\beta 1$ -Aktivierung in Perizyten zu einer verstärkten Proliferation und Motilität [78, 188, 235]. Dies ist besonders im Hinblick der starken Vaskularisierung des JA-Tumors interessant, da die NG2-abhängige Integrin-Aktivierung so nicht nur die Tumorprogression der Tumorzellen beeinflusst, sondern auch die Reifung und Funktionalität der für die Tumornährstoffversorgung notwendigen Blutgefäße [19]. Die Relevanz der Aktivierung des NG2-Integrin-Signalweges für die Angiogenese wurde durch NG2-Knockout-Maus-Studien verdeutlicht. Sowohl in einem retinalen Hyperoxie-Modell als auch in einem Hornhaut-Neovaskularisations-Modell in NG2-Knockout-Mäusen wurde eine reduzierte Proliferation der Perizyten detektiert, was wiederum in Blutgefäße mit strukturellen Defiziten resultierte [236, 237]. Diese Effekte wurden durch siRNA-vermittelte NG2-knockdown Studien in humanen Perizyten auf eine reduzierte Integrin $\beta 1$ -Aktivierung sowie eine reduzierte Aktivierung des nachfolgenden Effektors FAK zurückgeführt [188].

Zwar können die beobachteten anti-proliferativen und anti-migratorischen Effekte nach CK2-Inhibition im JA in den Zusammenhang mit einer reduzierten NG2-Expression gebracht werden, jedoch beeinflusst die CK2-Inhibition auch andere Signalkaskaden. Zum einen beeinflusst die CK2 angiogene Prozesse über die CK2-abhängige Aktivierung des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF)- 1α [238, 239]. Zum anderen fördert die CK2 über die Aktivierung verschiedener Signalwege wie Wnt, JAK/STAT, NF- κ B und p53 wichtige Kaskaden der Tumorprogression [41, 240]. Welche proliferative und migratorische Regulatoren konkret neben AKT und NG2 im JA durch die CK2-Inhibition beeinflusst werden, wurde in dieser Arbeit nicht weiter analysiert und ist somit eine Fragestellung für zukünftige Untersuchungen. Jedoch wurde durch Western Blot-Analysen des apoptotischen Markers cPARP ausgeschlossen, dass die reduzierte Proliferation und Aussprossung von JA-Zellen bzw. JA-Sphäroiden nach CK2-Inhibition reine Apoptose-induzierte Effekte sind.

Die im Rahmen des ersten Studienabschnittes durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass sich das JA aus NG2-exprimierenden Zellen zusammensetzt, wobei deutliche Unterschiede in der NG2-Expressionsstärke zwischen den JA-Geweben und JA-Zellen erkennbar waren. *In vitro* führte die enzymatische Inhibition der CK2 mit den Hemmstoffen CX-4945 und SGC-CK2-1 zu einer reduzierten NG2-Expression in JA-Zellen sowie zu einer reduzierten Proliferation und Migration dieser Zellen. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse erstmalig, dass eine CK2-Inhibition die Proliferation und Migration von NG2-exprimierenden JA-Zellen reduziert. Die erhobenen Daten unterstreichen somit die therapeutische Relevanz von NG2, nicht nur in malignen Tumoren, sondern auch im benignen JA.

7.1.1 Schlussfolgerung und Ausblick

Das JA ist ein histopathologisch benigner und vaskulärer Tumor, von dem hauptsächlich junge heranwachsende Männer betroffen sind [73, 74]. Je nach Schweregrad und Stadium des JAs wird die notwendige Tumorexstirpation durch intraoperative Komplikationen erschwert [73, 75]. Daher sollen neue alternative Therapieansätze der angiogenen und proliferativen Tumorprogression entgegenwirken. In diesem Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine CK2-Inhibition mit den Hemmstoffen CX-4945 und SGC-CK2-1 die Zellproliferation und Zellmigration von NG2-positiven JAs reduziert. Besonders im Hinblick auf den selektiven CK2-Inhibitor SGC-CK2-1 sind diese Ergebnisse ein eindeutiger Hinweis, dass diese Effekte nicht wie oft diskutiert auf off-target Effekten der CK2-Inhibitoren beruhen. Der CK2-Hemmstoff CX-4945 ist zwar ein etablierter Inhibitor, allerdings besitzt dieser aufgrund potenzieller mutagener und reproduktionstoxischer Eigenschaften auch Nachteile, besonders in Bezug auf den möglichen Therapieeinsatz bei jungen heranwachsenden Männern [72, 241]. Unter der Berücksichtigung der Daten aus der vorliegenden Arbeit ist daher der nicht-toxische CK2-Inhibitor SGC-CK2-1 ein vielversprechender Kandidat für die Behandlung von benignen NG2-positiven JAs.

7.2 miR-29b als Regulator der NG2-Expression im GBM

Die Expression des Proteoglykans NG2 ist durch die direkte und indirekte Aktivierung zahlreicher Signalwege der Zellproliferation, Zellmigration, Chemoresistenz und Angiogenese mit der onkogenen Transformation von Melanomen, GBM, triple-negativem Brustkrebs und SCCHN assoziiert [3, 14, 22]. Die funktionelle Rolle von NG2 wurde in den letzten Jahren vor allem in malignen Tumoren analysiert. Allerdings deuten die Ergebnisse aus dem ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass NG2 auch in benignen JA-Tumoren das angiogene und aggressive Tumorwachstum fördert. Jedoch ist für eine therapeutische Inhibition von NG2 zu beachten, dass dessen Expression auch in Tumoren auf bestimmte Zellpopulationen beschränkt ist. Sowohl im triple-negativen Brustkrebs als auch im SCCHN wurde gezeigt, dass lediglich Tumor-Subpopulationen NG2 exprimieren und besonders diese einen tumorfördernden Charakter besitzen [33, 169]. Auch im heterogenen GBM wird die NG2-exprimierende Subpopulation (83 %) mit einem aggressiven, proliferativen und invasiven Potential und einem schlechten Therapie-Outcome assoziiert [177, 242, 243]. In den letzten Jahren wurde bereits diskutiert, ob NG2 als Markerprotein für hoch-proliferative GBM-Tumore sowie als potenzielles Therapiemolekül dienen könnte [22, 169, 243]. Die durchgeführten TCGA-Analysen bestätigten, dass NG2 deutlich stärker im GBM exprimiert wird als in den niedriggradigeren Gliomen AC, ODG und AAC.

Trotz der zahlreichen Studien über die Auswirkungen einer dysregulierten NG2-Expression sind die genregulatorischen Mechanismen nicht vollständig aufgeklärt [21]. Bis heute werden

nur wenige genetische Alterationen von NG2 mit Pathologien in Verbindung gebracht [14]. Erst kürzlich wurde eine Keimbahnmutation in der D3-Subdomäne von NG2 (V2097M) detektiert [244]. Diese verhindert die Spaltung der NG2-Ektodomäne nach Aktivierung durch RTKs und führt zu einer anhaltenden Stimulierung des proliferativen RAS/MAPK/ERK-Signalweges bei der Neurofibromatose Typ 1 [244]. Auf epigenetischer Ebene resultiert die verstärkte NG2-Promotormethylierung in humanen Melanom-Zellen in einer erhöhten NG2-Expression [36]. Neben den bereits bekannten epigenetischen, transkriptionellen und physiologischen Faktoren sind jedoch auch posttranskriptionelle Mechanismen von essenzieller Bedeutung. Daher wurde im zweiten Studienabschnitt dieser Arbeit untersucht, wie die NG2-Expression posttranskriptionell reguliert wird, und zum anderen, wie ein Netzwerk aus transmembranen Interaktionspartnern im heterogenen GBM regulatorisch zusammenhängt. Mehrere miRNA-Screeninganalysen des GBMs konnten bereits ektopische miRNA-Profile detektieren. Dabei ist zum Beispiel die Expression der miR-124, miR-128 und miR-29b reduziert, während die Expression der miR-221 und miR-21 erhöht ist [159, 160, 245, 246]. Die miR-29b stand aufgrund der durchgeführten *in silico* Analysen während einer vorangegangenen Masterarbeit als möglicher Regulator der NG2-Expression im Fokus der vorliegenden Arbeit [163]. Zudem verdeutlichten mehrere Studien die negativen Auswirkungen einer dysregulierten miR-29b-Expression im GBM [160, 161, 247]. Durch die unterdrückte miR-29b-Expression fehlt ein Regulator des Glykoproteins Podoplanin (PDPN), ein putativer Marker für neurale Stammzellen, welcher die Invasion und Migration im GBM fördert [160]. Außerdem resultiert die Wiederherstellung der miR-29b-Expression in GBM-Zellen in einer verstärkten Zellapoptose infolge der miR-29b-abhängigen Reduktion von EMT-Proteinen, wie Kollagen-Isoformen, Elastin, Integrin $\alpha 11$ und MMP24 [161]. Weiterhin fördert die miR-29b-Überexpression die TMZ-Sensitivität von GBM-Zellen [247]. Insgesamt ist die Wiederherstellung des miR-29b-Expressionsprofils im GBM, im triple-negativen Brustkrebs und bei der akuten myeloischen Leukämie mit einer anti-kanzerogenen Wirkung und einer Tumorsuppressor-Funktion assoziiert [122, 153, 155, 248].

In den ersten *in vitro* Untersuchungen dieses Studienabschnittes sollte die gefundene *in silico* Regulation der NG2-3'-UTR durch die miR-29b bestätigt werden. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die NG2-Expression sowohl auf mRNA-Ebene als auch Proteinebene durch eine miR-29b-Überexpression reduziert wird. Dabei deutet der reduzierte NG2-mRNA-Gehalt auf einen posttranskriptionell induzierten Abbau durch die miR-29b hin. Tatsächlich wurde durch Reporteranalysen die direkte Interaktion der miR-29b mit der 3'-UTR von NG2 nachgewiesen. Neben der posttranskriptionellen Regulation der NG2-Expression durch miR-29b wurde zusätzlich deren Einfluss auf die transkriptionelle NG2-Regulation untersucht. Schmitt et al. [38] spekulierten bereits, dass der CK2-abhängige Transkriptionsfaktor Sp1 eine Rolle bei der NG2-Genexpression spielt. Interessanterweise ist

Sp1 ein Zielmolekül der miR-29b und wird zudem in zahlreichen Tumoren, wie auch dem GBM, verstärkt exprimiert und mit einem invasiven und metastasierenden Phänotyp assoziiert [181, 249, 250]. In der vorliegenden Arbeit konnte die posttranskriptionelle Regulation von Sp1 durch die miR-29b in NG2-positiven GBM-Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Sp1 die transkriptionelle Aktivität des NG2-Promotors verstärkt und die miR-29b-Überexpression dessen Aktivität reduziert. Ob die beobachtete, miR-29b-induzierte Reduktion der transkriptionellen Aktivität des NG2-Promotors über Sp1 abläuft, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und kann nur spekuliert werden. Jedoch wurde durch die durchgeführten Analysen eine eindeutige transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulation der NG2-Expression durch die miR-29b nachgewiesen.

Wie bereits erwähnt kann NG2 nur durch die Interaktion mit anderen Proteinen proliferative und angiogene Signalkaskaden regulieren [5, 14, 32]. In mehreren Studien wurde bereits die Rolle von NG2 in PDGF-stimulierten FAK- und MAPK-Signalkaskaden analysiert [15, 16, 197]. Diese zeigten, dass sowohl in O2A-Vorläuferzellen der Ratte als auch in glatten Muskelzellen der Aorta der Maus die NG2-PDGFR α -Interaktion essentiell für die proliferative PDGF-Signaltransduktion ist [16, 197]. Zudem ist PDGFR α nicht nur als Interaktionspartner von NG2 von Bedeutung, sondern auch in der Tumorprogression des GBMs [206, 251]. Tatsächlich ist eine *gain-of-function* Mutation von PDGFR α nach EGFR die zweithäufigste Veränderung einer Rezeptor-Tyrosinkinase im GBM und wird mit einer schlechten GBM-Prognose in Verbindung gebracht [206, 251, 252]. Neben PDGFR α stimuliert NG2 über die Interaktion mit Integrin β 1 die Aktivierung der ERK1/2- und PI3K/AKT-Signalwege, welche das Zellüberleben und die Zellproliferation fördern [102, 253]. Zusätzlich induzieren Integrin β 1-assoziierte Signalwege den mesenchymalen Stammzellcharakter des GBMs [254]. Weiterhin sind die NG2-Interaktionspartner PDGFR α und Integrin β 1 Zielmoleküle der miR-29b [146]. Dass PDGFR α ein Zielmolekül der miR-29b ist, wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig mittels *in silico* Analysen gezeigt. Anschließend wurde die direkte posttranskriptionelle Regulation von PDGFR α durch die miR-29b mittels Reportgenanalysen nachgewiesen. Neben PDGFR α und Integrin- β 1 wurde auch der Einfluss der miR-29b auf die PDGFR β -Expression analysiert. Zwar ist keine PDGFR β -NG2-Interaktion bekannt, jedoch werden beide Oberflächenproteine coexprimiert [15, 182, 183]. Darüber hinaus wird PDGFR β durch die miR-29b inhibiert und ist ebenfalls in der GBM-Tumorprogression involviert [184-187]. Insgesamt wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass miR-29b die NG2-, Integrin β 1-, PDGFR α - und PDGFR β -Expression in NG2-positiven GBM-Zellen reguliert.

Zur Analyse der Auswirkungen der miR-29b-abhängigen Reduktion von NG2, Integrin β 1, PDGFR α und PDGFR β auf die *downstream*-Signalkaskaden wurden zunächst die beiden Hauptsignalwege AKT und FAK untersucht. Wie bereits erwähnt, führt eine NG2-Interaktion mit Integrin β 1 und PDGFR α zur Stimulierung der FAK, ERK1/2 und PI3K/AKT Signalwege,

wodurch Zellwachstum und Zellüberleben gefördert werden [16, 19, 102, 253]. Die durchgeführten Analysen der NG2-abhängigen Integrin- β 1 und PDGFR α Signalkaskaden von miR-29b-Mimic-transfizierten GBM-Zellen ergaben nicht wie erwartet eine reduzierte Aktivierung der downstream-Effektoren AKT und FAK, sondern deren verstärkte Phosphorylierung an S437 bzw. Y397. Ähnliche Effekte beobachteten auch Xia et al. [189] in adipösen mesenchymalen Stammzellen. Dort resultierte eine Überexpression der miR-29b in einer Aktivierung des AKT/ β -catenin Signalweges. Dieser Effekt wurde durch eine direkte posttranskriptionelle Inhibierung der PTEN-Expression durch die miR-29b erklärt [189]. Die Phosphatase PTEN katalysiert die Dephosphorylierung von PIP3 zu PIP2 und ist ein Antagonist der PI3K/AKT-Signalkaskade [255, 256]. Dementsprechend resultiert die miR-29b-abhängige Reduktion der PTEN-Expression in einem erhöhten PIP3-Level, wodurch AKT aktiviert wird und somit Prozesse der Zelldifferenzierung, des Zellüberlebens und der Zellproliferation gefördert werden [189, 257, 258]. Zusätzlich interagiert PTEN mit FAK und dephosphoryliert die Kinase an Y397 [190, 191]. Mehrere Studien zeigten, dass eine Überexpression von PTEN die Aktivierung von FAK reduziert, wohingegen eine miRNA-abhängige Reduktion von PTEN die aktivierende Phosphorylierung von FAK sowie AKT erhöht [194-196]. Tatsächlich wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die miR-29b-Überexpression bzw. -Inhibition in GBM-Zellen eine Reduktion bzw. Erhöhung der PTEN-Expression zufolge hat. Diese Beeinflussung erklärt die detektierte Aktivierung der proliferativen Signalwege AKT und FAK, obwohl die miR-29b-Überexpression die Expression der Interaktionspartner NG2, Integrin- β 1 und PDGFR α reprimiert. Da bereits andere Studien einen anti-proliferativen Einfluss der miR-29b in GBM-Zellen nachgewiesen haben, wurde zusätzlich der ERK1/2-Signalweg analysiert [161, 247, 259]. Hier konnte nach miR-29b-Mimic- bzw. miR-29b-Inh-Transfektion eine Reduktion bzw. Erhöhung der Phosphorylierung von ERK1/2 nachgewiesen werden.

In einem nächsten Schritt dieser Arbeit wurde der Einfluss der miR-29b auf die Zellmigration und Zellproliferation in mehreren *in vitro* Analysen untersucht. Hierbei konnte mittels WST-1- und *scratch*-Assays eine anti-proliferative Wirkung der miR-29b in GBM-Zellen nachgewiesen werden. Zudem zeigten miR-29b-Mimic-transfizierte Zellen in *spheroid sprouting*- und Transwell-Assays eine reduzierte Migration. Die beobachteten Effekte lassen sich auf eine verminderte Aktivierung der ERK-Signalkaskade durch eine miR-29b-abhängige Reduktion der stimulierenden Transmembranproteine NG2, Integrin β 1, PDGFR α und PDGFR β zurückführen. Einen Einfluss der aktivierten AKT- und FAK-Signalwege nach miR-29b-Überexpression auf die Zellmigration und Zellproliferation wurde in den durchgeführten *in vitro* Analysen nicht detektiert. Der beobachtete starke anti-proliferative Effekt des unterdrückten ERK1/2-Signalwegs lässt sich dadurch erklären, dass die NG2-vermittelte Integrin-Aktivierung zu einer konstitutiven Aktivierung von ERK1/2 führt [14, 260]. Aufgrund dieser konstitutiven

Aktivierung kann vermutet werden, dass die miR-29b-vermittelte Reduktion des NG2/Integrin β 1/ERK1/2-Signalwegs ausreicht, um der proliferativen AKT- und FAK-Aktivierung entgegenzuwirken. Um dies nachzuweisen, könnte in weiteren Analysen der anti-proliferative Einfluss der miR-29b-Überexpression in Kombination mit einer ERK1/2-Inhibition in GBM-Zellen analysiert werden.

Allgemein muss jedoch berücksichtigt werden, dass miR-29b die Expression von weiteren Zielmolekülen beeinflusst und die hier gezeigten Ergebnisse höchstwahrscheinlich auf ein großes regulatorisches Netzwerk zurückzuführen sind. Zum Beispiel ist das myeloische Leukämie-Zelldifferenzierungsprotein (Mcl)-1 ein Zielmolekül der miR-29b [261]. Das anti-apoptotische wirkende Mcl-1 gehört zu den häufigsten amplifizierten Genen in Tumoren, einschließlich dem GBM, und fördert das Zellüberleben über die Inhibierung der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und der Freisetzung von Cytochrom C [261, 262]. Diesbezüglich detektierten Aldaz et al. [263] eine verstärkte Apoptose infolge einer miR-29b-abhängigen Mcl-1-Reduktion in GBM-Zellen. Zudem zeigten Shi et al. [264], dass die miR-29b-abhängige Inhibierung des *cell division control protein* (CDC)42 die Migration und Invasion von GBM-Zellen supprimiert. Weiterhin konnten Shi et al. [265] in einer kürzlich veröffentlichten Studie zeigen, dass miR-29b die p53-induzierte Apoptose fördert, indem diese die CDC42/p21-aktivierte Kinase (PAK)/AKT/*mouse double minute 2 homolog* (MDM2)-Signalkaskade unterdrückt. Außerdem reguliert miR-29b ein großes Netzwerk an prometastasierenden Regulatoren, wie VEGF α , MMP-9, Integrin- α 6 und Kollagen Isoformen [156]. Zusätzlich sollte die in dieser Arbeit beobachtete negative Regulation des Tumorsuppressors PTEN durch die miR-29b genauer analysiert werden. Im GBM wird durch die gezielte Unterdrückung der PTEN-Expression die Proliferation und Migration gefördert, indem über die PI3K/AKT-Aktivierung die Mechanismen der EMT und der Glykolyse stimuliert werden [266-269]. Daher ist es von Relevanz, die Auswirkungen der miR-29b-abhängigen Reduktion von PTEN in zukünftigen Studien zu untersuchen. Zudem sollte der Einfluss der miR-29b in weiteren Tumor-Zelllinien analysiert werden, da die beobachtete AKT- und FAK-Aktivierung infolge der miR-29b-Überexpression in anderen Studien nicht beobachtet wurde [270, 271].

Mehrere Studien zeigten bereits, dass die Expression der miR-29b im GBM reprimiert ist, jedoch wurden die genregulatorischen Ursachen noch nicht analysiert. Im Jahre 2016 zeigten Tang et al. [198], dass die funktionelle Wirkung der miR-29b posttranskriptionell durch die direkte Bindung der lncRNA H19 inhibiert wird. Das 2,3 kb große RNA-Molekül wird durch das auf Chromosom 11p15.5 lokalisierte maternal geprägte H19-Gen codiert [272]. Während der Embryogenese spielt H19 eine wichtige Rolle in der Regulation der Stammzelldifferenzierung im Nebennieren-, Muskel- und Lebergewebe [273, 274]. Im adulten Gewebe wird die Expression signifikant herunterreguliert, jedoch besitzt H19 weiterhin eine essenzielle

Funktion, unter anderem in der Differenzierung und Regeneration der Skelettmuskulatur [275, 276]. Auf regulatorischer Ebene rekrutiert H19 zum einen Histon-Methyltransferasen für das epigenetische Silencing von Genen, zum anderen besitzt H19 mehrere miRNA-Bindestellen und unterdrückt deren inhibitorische Wirkung [274, 277]. In den letzten Jahren wurde eine erhöhte H19-Expression mit der Angiogenese, der Fibrose und der Tumorprogression in Verbindung gebracht [274, 278]. Dabei fördert die ektopische H19-Expression die Tumorprogression im GBM sowie im Mamma- und Leberzellkarzinom durch eine verstärkte EMT, Zellviabilität, Zellmigration und Zellinvasion [274, 278, 279]. Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die H19-Expression positiv mit dem Malignitätsgrad von Gliomen korreliert. Erst kürzlich wurde berichtet, dass die erhöhte H19-Expression im GBM die Autophagie durch die Inhibierung der miR-491 fördert [199]. Weiterhin stimuliert die H19-Überexpression die Proliferation, Migration und EMT von Harnblasenkarzinom-Zellen durch die Inhibierung der miR-29b [280]. Dieser inhibitorische Effekt der H19 wurde auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen. So führte die H19-Überexpression zu einer reduzierten miR-29b-Expression in GBM-Zellen. Weiterhin wurde eine erhöhte NG2-Expression detektiert, was wiederum auf einen posttranskriptionell aktiven NG2-3'-UTR infolge der miR-29b-Inhibierung zurückgeführt werden konnte.

Interessanterweise wird die H19 durch den Transkriptionsfaktor c-Myc reguliert [204, 205]. Im GBM wird die ektopische Expression des Proto-Onkogens c-Myc mit der Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters und der Tumorprogression in Verbindung gebracht [202, 281, 282]. Als Transkriptionsfaktor ist c-Myc im GBM verantwortlich für die Hochregulation von EGFR, die transkriptionelle Repression mehrerer Chemoresistenz-assoziierten miRNAs und die transkriptionelle Aktivierung von H19 [283-286]. Die Aktivierung der H19-Expression durch c-Myc wurde auch in der vorliegenden Arbeit in GBM-Zellen nachgewiesen. Zudem resultierte die c-Myc-vermittelte H19-Expression in einer verstärkten NG2-Expression infolge der miR-29b-Inhibition. Die detektierten Effekte könnten jedoch auch auf die direkte Inhibition der miR-29b Transkription durch c-Myc zurückgeführt werden, denn in mehreren Studien wurde bereits c-Myc als direkter Repressor der miR-29b-Genexpression beschrieben [135, 287, 288]. Zwar wurde die transkriptionelle Regulation der miR-29b durch c-Myc in dieser Arbeit nicht analysiert, jedoch verdeutlicht die Anzahl der inhibitorischen Regulationsmechanismen der miR-29b-Genexpression durch zwei Onkogene die Relevanz der miR-29b-Unterdrückung während der GBM-Progression.

Aufgrund des heterogenen Phänotyps wird das GBM auf der Grundlage von spezifischen Genexpressionen in die Subtypen CL, MES, PN und NE unterteilt [206]. Erst kürzlich wurde die Unterteilung des GBMs auf drei Subtypen revidiert, da der NE-Subtyp wahrscheinlich eine Mischpopulation aus Tumorgewebe und gesundem neuronalem Gewebe der Tumorränder ist [289]. Obwohl die GBM-Subtypen nur teilweise Aufschluss über die Tumorprogression und die

Prognose geben, sind die molekularen Profile mit Subtyp-spezifischen regulatorischen Signalwegen von wissenschaftlichem Interesse und sollen die Entwicklung von effizienten Therapien anhand homogener Gruppen verbessern [290, 291]. In der vorliegenden Arbeit wurde mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven eine verkürzte Überlebenszeit der GBM-Patienten mit einer verstärkten PDGFRA-, PDGFRB-, ITGB1- und NG2-Expression in den NE- und MES-Subtypen in Verbindung gebracht. Bei der Betrachtung der molekularen Charakteristika des MES-Subtyps fällt eine Subtyp-spezifische Myc-Expression auf [291]. Die Überexpression kann auf EGFR-vermittelte Signalwege zurückgeführt werden, wobei c-Myc durch die Inhibierung der miR-29b-Expression eine wichtige Funktion in der EMT einnimmt [292]. Dies ist besonders im Hinblick der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit interessant. c-Myc als spezifischer MES-Subtyp-Transkriptionsfaktor inhibiert die miR-29b als fundamentaler Regulator der EMT, wodurch die untersuchten Transmembranproteine PDGFR α , PDGFR β , Integrin β 1 und NG2 verstärkt exprimiert werden. Diese spielen als Verknüpfungsstelle zwischen der extrazellulären und intrazellulären Signaltransduktion eine entscheidende Rolle in der EMT [14, 293, 294]. Allerdings sollte bei den durchgeführten Expressionsanalysen beachtet werden, dass NG2 nur von einer GBM-Subpopulation exprimiert wird und dies die statistische Auswertung beeinträchtigt [242, 243]. In weiteren Analysen könnte die Expression der miR-29b und der NG2-Interaktionspartner ausschließlich in NG2-positiven Subpopulationen analysiert werden. Zusammenfassend konnte im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit die miR-29b als wichtiger anti-proliferativer Regulator im GBM identifiziert werden. Die Daten zeigen erstmalig, dass NG2 und PDGFR α posttranskriptionell durch die miR-29b reguliert werden. Zudem reduziert die miR-29b posttranskriptionell die Expression eines transmembranen Proteinnetzwerkes bestehend aus NG2, Integrin β 1, PDGFR α und PDGFR β . Die kumulative Interaktion dieser Transmembranproteine führt zur Aktivierung der proliferativen und migratorischen FAK-, AKT-, und ERK1/2-Signalwege (*Abbildung 41*). Zwar fördert die miR-29b durch die Inhibierung von PTEN die Aktivierung von AKT und FAK, jedoch zeigten die durchgeführten *in vitro* Analysen eine deutliche Inhibierung der Zellproliferation und Zellmigration (*Abbildung 41*). Die detektierten anti-proliferativen und anti-migratorischen Effekte einer miR-29b-Überexpression im GBM resultieren aus der reduzierten ERK1/2-Aktivierung. Insgesamt konnte in Bezug auf das GBM in der vorliegenden Arbeit eine c-Myc- und H19-vermittelte Inhibition der miR-29b gefunden werden, was wiederum mit der verstärkten Expression der Interaktionspartner NG2, Integrin- β 1, PDGFR α und PDGFR β einhergeht und mit einer aggressiven Tumorprogression assoziiert ist.

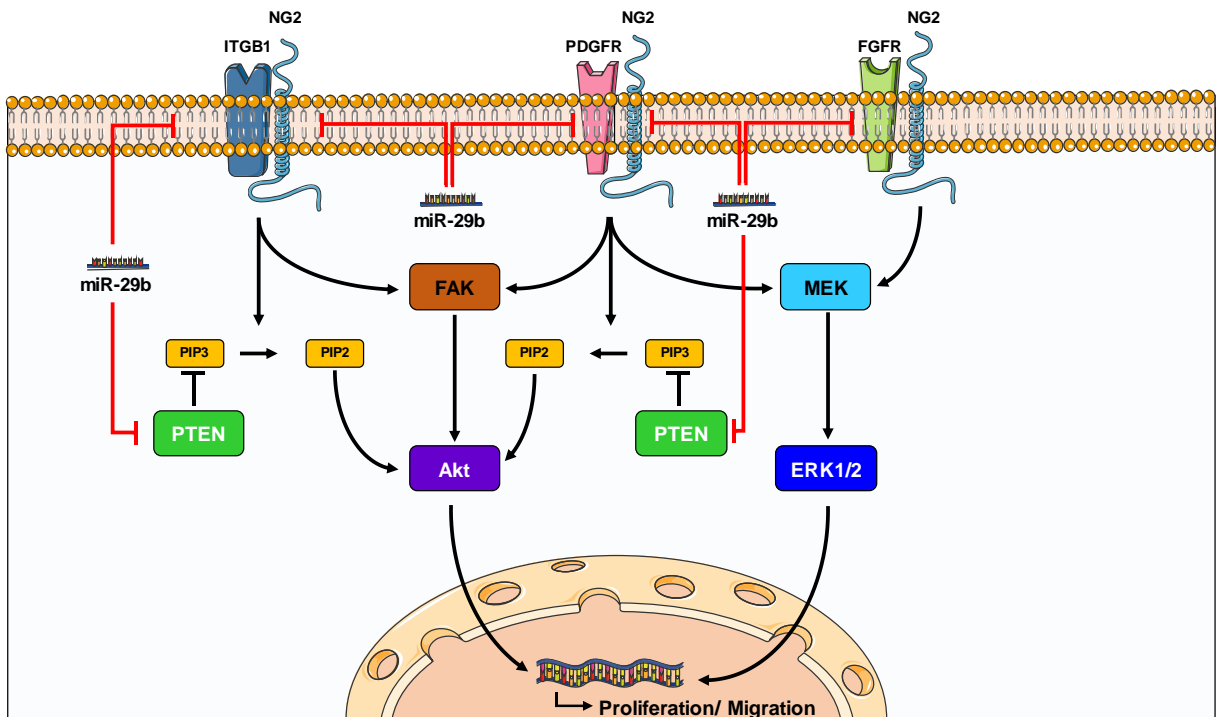


Abbildung 41: Regulatorischer Einfluss der miR-29b auf transmembrane Signalkaskaden. Die Interaktion von NG2 mit Integrin $\beta 1$ (ITGB1), PDGFR und FGFR aktiviert die proliferativen AKT-, FAK- und ERK1/2-Signalkaskaden. Die miR-29b inhibiert posttranskriptionell die Expression von NG2, Integrin $\beta 1$ (ITGB1), PDGFR und FGFR. Zusätzlich aktiviert miR-29b durch die PTEN-Inhibition die AKT- und FAK-Signalwege.

7.2.1 Schlussfolgerung und Ausblick

Das GBM ist trotz jahrzehntelanger Forschung nach wie vor eine letale neurologische Malignität. Seit der Einführung des Standardtherapieprotokolls mit TMZ im Jahr 2005 konnte die mediane Überlebenszeit durch Optimierungen des Standardtherapieprotokolls, fortgeschrittener bildgebender Diagnostik und Strahlentherapie sowie *tumor treating fields* nur von 12 Monaten auf 16 Monate erhöht werden. Dabei erschwert die Heterogenität des GBM mit der hohen Anzahl an dysregulierten Signalwegen in verschiedenen Subpopulationen innerhalb eines Tumors die Entwicklung von gezielten Therapiemöglichkeiten [295, 296].

Das in dieser Arbeit im Fokus stehende Proteoglykan NG2 wird zwar nur von einer GBM-Subpopulation exprimiert, allerdings kann NG2 durch trans-Interaktionen mit benachbarten Zellen auch in NG2-negativen Zellen die Integrin-Aktivierung und die damit verbundene Migration und Angiogenese stimulieren [19]. Die Bedeutung von NG2 während der Tumorprogression ist seit Jahren bekannt, jedoch gestaltet sich die gezielte NG2-Inhibition als schwierig [5, 14, 33, 297]. Ein möglicher NG2-Therapieansatz wäre die CK2-Inhibition, welche auch im ersten Studienabschnitt dieser Arbeit für das JA thematisiert wurde [39]. Zugleich fokussieren sich eine Vielzahl von NG2-Studien auf Immuntherapien mit mAKs, antiidiotypischen Antikörpern, BiTE-Antikörpern oder auf die Radioimmuntherapie [33, 214-222]. Jedoch stellt neben der starken immunsuppressiven Tumormikroumgebung des GBMs

auch die intra- und intertumorale Heterogenität eine große Herausforderung für immuntherapeutische Ansätze dar [225, 298]. Denn diese Heterogenität schränkt die gezielte Aktivierung der T-Zell Immunantwort ein, wodurch Immuntherapien wie CAR-T-Zelltherapien im GBM keine effektive Wirkung zeigen [299, 300].

Auch der Einsatz von miRNA-basierten Therapien wird durch die Entwicklung geeigneter *delivery* Systeme beeinträchtigt, welche die Tumorzellspezifität, die Stabilität und den Transport über die Blut-Hirn-Schranke gewährleisten müssen [301]. Jedoch bilden die im letzten Jahrzehnt entwickelten Systeme eine wichtige Grundlage im Hinblick auf eine präzise translationale Tumorthherapie [302, 303]. Ein vielversprechender Ansatz könnte die intravenöse Injektion von Gliom-spezifischen kationischen lipid-basierten Nanopartikeln mit Octaarginin-Peptiden sein [303]. Diese Nanopartikel können sowohl mit hydrophilen miRNA-Molekülen als auch hydrophoben Zytostatika wie TMZ beladen werden [303]. Die Beladung von Nanopartikeln mit miR-29b und TMZ könnte somit eine vielversprechende Strategie zur Therapie des NG2-positiven GBM darstellen.

8 Literaturverzeichnis

1. **Wilson BS, Imai K, Natali PG and Ferrone S.** Distribution and molecular characterization of a cell-surface and a cytoplasmic antigen detectable in human melanoma cells with monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 28: 293-300, 1981
2. **Stallcup WB.** The NG2 antigen, a putative lineage marker: immunofluorescent localization in primary cultures of rat brain. *Dev Biol* 83: 154-165, 1981
3. **Campoli M, Ferrone S and Wang X.** Functional and clinical relevance of chondroitin sulfate proteoglycan 4. *Adv Cancer Res* 109: 73-121, 2010
4. **Trotter J, Karram K and Nishiyama A.** NG2 cells: properties, progeny and origin. *Brain Res Rev* 63: 72-82, 2010
5. **Schiffer D, Mellai M, Boldorini R, Bisogno I, Grifoni S, Corona C, Bertero L, Cassoni P, Casalone C and Annovazzi L.** The significance of chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4) in human gliomas. *Int J Mol Sci* 19: 2724, 2018
6. **Nishiyama A, Dahlin KJ, Prince JT, Johnstone SR and Stallcup WB.** The primary structure of NG2, a novel membrane-spanning proteoglycan. *J Cell Biol* 114: 359-371, 1991
7. **Stallcup WB.** The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects. *J Neurocytol* 31: 423-435, 2002
8. **Fukushi J, Makagiansar IT and Stallcup WB.** NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin-3 and alpha3beta1 integrin. *Mol Biol Cell* 15: 3580-3590, 2004
9. **Chatterjee N, Stegmüller J, Schätzle P, Karram K, Koroll M, Werner HB, Nave KA and Trotter J.** Interaction of syntenin-1 and the NG2 proteoglycan in migratory oligodendrocyte precursor cells. *J Biol Chem* 283: 8310-8317, 2008
10. **Makagiansar IT, Williams S, Mustelin T and Stallcup WB.** Differential phosphorylation of NG2 proteoglycan by ERK and PKCalpha helps balance cell proliferation and migration. *J Cell Biol* 178: 155-165, 2007
11. **Bourguignon LY.** CD44-mediated oncogenic signaling and cytoskeleton activation during mammary tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6: 287-297, 2001
12. **Beauvais DM and Rapraeger AC.** Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reprod Biol Endocrinol* 2: 3, 2004
13. **Couchman JR.** Transmembrane signaling proteoglycans. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26: 89-114, 2010
14. **Price MA, Colvin Wanshura LE, Yang J, Carlson J, Xiang B, Li G, Ferrone S, Dudek AZ, Turley EA and McCarthy JB.** CSPG4, a potential therapeutic target, facilitates malignant progression of melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 1148-1157, 2011
15. **Goretzki L, Burg MA, Grako KA and Stallcup WB.** High-affinity binding of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-AA to the core protein of the NG2 proteoglycan. *J Biol Chem* 274: 16831-16837, 1999

16. **Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH and Stallcup WB.** Interaction between NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells is required for optimal response to PDGF. *J Neurosci Res* 43: 315-330, 1996
17. **Tillet E, Gentil B, Garrone R and Stallcup WB.** NG2 proteoglycan mediates beta1 integrin-independent cell adhesion and spreading on collagen VI. *J Cell Biochem* 86: 726-736, 2002
18. **Lin XH, Dahlin-Huppe K and Stallcup WB.** Interaction of the NG2 proteoglycan with the actin cytoskeleton. *J Cell Biochem* 63: 463-477, 1996
19. **Stallcup WB.** NG2 proteoglycan enhances brain tumor progression by promoting beta-1 integrin activation in both cis and trans orientations. *Cancers (Basel)* 9: 31, 2017
20. **Yadavilli S, Hwang EI, Packer RJ and Nazarian J.** The role of NG2 proteoglycan in glioma. *Transl Oncol* 9: 57-63, 2016
21. **Ampofo E, Schmitt BM, Menger MD and Laschke MW.** The regulatory mechanisms of NG2/CSPG4 expression. *Cell Mol Biol Lett* 22: 4, 2017
22. **Nicolosi PA, Dallatomasina A and Perris R.** Theranostic impact of NG2/CSPG4 proteoglycan in cancer. *Theranostics* 5: 530-544, 2015
23. **Shoshan Y, Nishiyama A, Chang A, Mörk S, Barnett GH, Cowell JK, Trapp BD and Staugaitis SM.** Expression of oligodendrocyte progenitor cell antigens by gliomas: implications for the histogenesis of brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10361-10366, 1999
24. **Stallcup WB, You WK, Kucharova K, Cejudo-Martin P and Yotsumoto F.** NG2 proteoglycan-dependent contributions of pericytes and macrophages to brain tumor vascularization and progression. *Microcirculation* 23: 122-133, 2016
25. **Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R and Zhu X.** Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat Rev Neurosci* 10: 9-22, 2009
26. **Tamburini E, Dallatomasina A, Quartararo J, Cortelazzi B, Mangieri D, Lazzaretti M and Perris R.** Structural deciphering of the NG2/CSPG4 proteoglycan multifunctionality. *FASEB J* 33: 3112-3128, 2019
27. **Huang FJ, You WK, Bonaldo P, Seyfried TN, Pasquale EB and Stallcup WB.** Pericyte deficiencies lead to aberrant tumor vascularization in the brain of the NG2 null mouse. *Dev Biol* 344: 1035-1046, 2010
28. **Schlingemann RO, Rietveld FJ, de Waal RM, Ferrone S and Ruiter DJ.** Expression of the high molecular weight melanoma-associated antigen by pericytes during angiogenesis in tumors and in healing wounds. *Am J Pathol* 136: 1393-1405, 1990
29. **Chang A, Nishiyama A, Peterson J, Prineas J and Trapp BD.** NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J Neurosci* 20: 6404-6412, 2000
30. **Nielsen HM, Ek D, Avdic U, Orbjörn C, Hansson O, Veerhuis R, Rozemuller AJ, Brun A, Minthon L and Wennström M.** NG2 cells, a new trail for Alzheimer's disease mechanisms? *Acta Neuropathol Commun* 1: 7, 2013

31. **Zhang Z, Li X, Zhou H and Zhou J.** NG2-glia crosstalk with microglia in health and disease. *CNS Neurosci Ther* 28: 1663-1674, 2022
32. **Stallcup WB and Huang FJ.** A role for the NG2 proteoglycan in glioma progression. *Cell Adh Migr* 2: 192-201, 2008
33. **Wang X, Osada T, Wang Y, Yu L, Sakakura K, Katayama A, McCarthy JB, Brufsky A, Chivukula M, Khoury T, Hsu DS, Barry WT, Lyerly HK, Clay TM and Ferrone S.** CSPG4 protein as a new target for the antibody-based immunotherapy of triple-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 102: 1496-1512, 2010
34. **Murfee WL, Rehorn MR, Peirce SM and Skalak TC.** Perivascular cells along venules upregulate NG2 expression during microvascular remodeling. *Microcirculation* 13: 261-273, 2006
35. **Rhodes KE, Raivich G and Fawcett JW.** The injury response of oligodendrocyte precursor cells is induced by platelets, macrophages and inflammation-associated cytokines. *Neuroscience* 140: 87-100, 2006
36. **Luo W, Wang X, Kageshita T, Wakasugi S, Karpf AR and Ferrone S.** Regulation of high molecular weight-melanoma associated antigen (HMW-MAA) gene expression by promoter DNA methylation in human melanoma cells. *Oncogene* 25: 2873-2884, 2006
37. **Warta R, Herold-Mende C, Chaisaingmongkol J, Popanda O, Mock A, Mogler C, Osswald F, Herpel E, Küstner S, Eckstein V, Plass C, Plinkert P, Schmezer P and Dyckhoff G.** Reduced promoter methylation and increased expression of CSPG4 negatively influences survival of HNSCC patients. *Int J Cancer* 135: 2727-2734, 2014
38. **Schmitt BM, Boewe AS, Becker V, Nalbach L, Gu Y, Götz C, Menger MD, Laschke MW and Ampfo E.** Protein kinase CK2 regulates nerve/glial antigen (NG)2-mediated angiogenic activity of human pericytes. *Cells* 9: 1546, 2020
39. **Schmitt BM, Boewe AS, Götz C, Philipp SE, Urbschat S, Oertel J, Menger MD, Laschke MW and Ampfo E.** CK2 activity mediates the aggressive molecular signature of glioblastoma multiforme by inducing nerve/glial antigen (NG)2 expression. *Cancers (Basel)* 13: 1678, 2021
40. **Yadavilli S, Hwang EI, Packer RJ and Nazarian J.** The role of NG2 proteoglycan in glioma. *Transl Oncol* 9: 57-63, 2016
41. **Meggio F and Pinna LA.** One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J* 17: 349-368, 2003
42. **Borgo C, D'Amore C, Sarno S, Salvi M and Ruzzene M.** Protein kinase CK2: a potential therapeutic target for diverse human diseases. *Signal Transduct Target Ther* 6: 183, 2021
43. **Salvi M, Sarno S, Cesaro L, Nakamura H and Pinna LA.** Extraordinary pleiotropy of protein kinase CK2 revealed by weblogo phosphoproteome analysis. *Biochim Biophys Acta* 1793: 847-859, 2009
44. **Niefind K, Pütter M, Guerra B, Issinger OG and Schomburg D.** GTP plus water mimic ATP in the active site of protein kinase CK2. *Nat Struct Biol* 6: 1100-1103, 1999

45. **Nienberg C, Retterath A, Becher KS, Saenger T, Mootz HD and Jose J.** Site-specific labeling of protein kinase CK2: combining surface display and click chemistry for drug discovery applications. *Pharmaceuticals (Basel)* 9: 36, 2016
46. **Boldyreff B, Meggio F, Pinna LA and Issinger OG.** Protein kinase CK2 structure-function relationship: effects of the beta subunit on reconstitution and activity. *Cell Mol Biol Res* 40: 391-399, 1994
47. **Wirkner U, Voss H, Lichter P, Ansorge W and Pyerin W.** The human gene (CSNK2A1) coding for the casein kinase II subunit alpha is located on chromosome 20 and contains tandemly arranged Alu repeats. *Genomics* 19: 257-265, 1994
48. **Ackermann K, Neidhart T, Gerber J, Waxmann A and Pyerin W.** The catalytic subunit alpha' gene of human protein kinase CK2 (CSNK2A2): genomic organization, promoter identification and determination of Ets1 as a key regulator. *Mol Cell Biochem* 274: 91-101, 2005
49. **Pinna LA.** Protein kinase CK2: a challenge to canons. *J Cell Sci* 115: 3873-3878, 2002
50. **Götz C and Montenarh M.** Protein kinase CK2 in development and differentiation. *Biomed Rep* 6: 127-133, 2017
51. **Lou DY, Dominguez I, Toselli P, Landesman-Bollag E, O'Brien C and Seldin DC.** The alpha catalytic subunit of protein kinase CK2 is required for mouse embryonic development. *Mol Cell Biol* 28: 131-139, 2008
52. **Buchou T, Vernet M, Blond O, Jensen HH, Pointu H, Olsen BB, Cochet C, Issinger OG and Boldyreff B.** Disruption of the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 23: 908-915, 2003
53. **Xu X, Toselli PA, Russell LD and Seldin DC.** Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit. *Nat Genet* 23: 118-121, 1999
54. **Juhl C, Mörl K and Beck-Sickinger AG.** Adiponectin receptor 1 interacts with both subunits of protein kinase CK2. *Mol Cell Biochem* 356: 185-189, 2011
55. **Taylor KM, Hiscox S, Nicholson RI, Hogstrand C and Kille P.** Protein kinase CK2 triggers cytosolic zinc signaling pathways by phosphorylation of zinc channel ZIP7. *Sci Signal* 5: ra11, 2012
56. **Shehata M, Schnabl S, Demirtas D, Hilgarth M, Hubmann R, Ponath E, Badrnya S, Lehner C, Hoelbl A, Duechler M, Gaiger A, Zielinski C, Schwarzmeier JD and Jaeger U.** Reconstitution of PTEN activity by CK2 inhibitors and interference with the PI3-K/Akt cascade counteract the antiapoptotic effect of human stromal cells in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 116: 2513-2521, 2010
57. **Gao Y and Wang HY.** Casein kinase 2 is activated and essential for Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 281: 18394-18400, 2006
58. **McKendrick L, Milne D and Meek D.** Protein kinase CK2-dependent regulation of p53 function: evidence that the phosphorylation status of the serine 386 (CK2) site of p53 is constitutive and stable. *Mol Cell Biochem* 191: 187-199, 1999

59. **Armstrong SA, Barry DA, Leggett RW and Mueller CR.** Casein kinase II-mediated phosphorylation of the C terminus of Sp1 decreases its DNA binding activity. *J Biol Chem* 272: 13489-13495, 1997
60. **Yu M, Yeh J and Van Waes C.** Protein kinase casein kinase 2 mediates inhibitor-kappaB kinase and aberrant nuclear factor-kappaB activation by serum factor(s) in head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 66: 6722-6731, 2006
61. **Chua MMJ, Lee M and Dominguez I.** Cancer-type dependent expression of CK2 transcripts. *PLoS One* 12: e0188854, 2017
62. **Strum SW, Gyenis L and Litchfield DW.** CSNK2 in cancer: pathophysiology and translational applications. *Br J Cancer* 126: 994-1003, 2022
63. **Buljan M, Ciuffa R, van Drogen A, Vichalkovski A, Mehnert M, Rosenberger G, Lee S, Varjosalo M, Pernas LE, Spegg V, Snijder B, Aebersold R and Gstaiger M.** Kinase interaction network expands functional and disease roles of human kinases. *Mol Cell* 79: 504-520.e509, 2020
64. **Torres J and Pulido R.** The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem* 276: 993-998, 2001
65. **Di Maira G, Salvi M, Arrigoni G, Marin O, Sarno S, Brustolon F, Pinna LA and Ruzzene M.** Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. *Cell Death Differ* 12: 668-677, 2005
66. **Olsen BB, Svenstrup TH and Guerra B.** Downregulation of protein kinase CK2 induces autophagic cell death through modulation of the mTOR and MAPK signaling pathways in human glioblastoma cells. *Int J Oncol* 41: 1967-1976, 2012
67. **Chua MM, Ortega CE, Sheikh A, Lee M, Abdul-Rassoul H, Hartshorn KL and Dominguez I.** CK2 in cancer: cellular and biochemical mechanisms and potential therapeutic target. *Pharmaceuticals (Basel)* 10: 18, 2017
68. **Trembley JH, Wang G, Unger G, Slaton J and Ahmed K.** Protein kinase CK2 in health and disease: CK2: a key player in cancer biology. *Cell Mol Life Sci* 66: 1858-1867, 2009
69. **Zheng Y, McFarland BC, Drygin D, Yu H, Bellis SL, Kim H, Bredel M and Benveniste EN.** Targeting protein kinase CK2 suppresses prosurvival signaling pathways and growth of glioblastoma. *Clin Cancer Res* 19: 6484-6494, 2013
70. **Sarno S, Reddy H, Meggio F, Ruzzene M, Davies SP, Donella-Deana A, Shugar D and Pinna LA.** Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Lett* 496: 44-48, 2001
71. **Pierre F, Chua PC, O'Brien SE, Siddiqui-Jain A, Bourbon P, Haddach M, Michaux J, Nagasawa J, Schwaebe MK, Stefan E, Vialettes A, Whitten JP, Chen TK, Darjania L, Stansfield R, Anderes K, Bliesath J, Drygin D, Ho C, Omori M, Proffitt C, Streiner N, Trent K, Rice WG and Ryckman DM.** Discovery and SAR of 5-(3-chlorophenylamino)benzo[c][2,6]naphthyridine-8-carboxylic acid (CX-4945), the first clinical stage inhibitor of protein kinase CK2 for the treatment of cancer. *J Med Chem* 54: 635-654, 2011

72. **Wells CI, Drewry DH, Pickett JE, Tjaden A, Krämer A, Müller S, Gyenis L, Menyhart D, Litchfield DW, Knapp S and Axtman AD.** Development of a potent and selective chemical probe for the pleiotropic kinase CK2. *Cell Chem Biol* 28: 546-558.e510, 2021
73. **Li W, Ni Y, Lu H, Hu L and Wang D.** Current perspectives on the origin theory of juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Discov Med* 27: 245-254, 2019
74. **McGarey PO, David AP and Payne SC.** Nasopharyngeal angiofibroma in a 32-year-old man. *BMJ Case Reports* 2018: bcr-2017-222763, 2018
75. **Radkowski D, McGill T, Healy GB, Ohlms L and Jones DT.** Angiofibroma. Changes in staging and treatment. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 122: 122-129, 1996
76. **Alshaikh NA and Eleftheriadou A.** Juvenile nasopharyngeal angiofibroma staging: An overview. *Ear Nose Throat J* 94: E12-22, 2015
77. **Beham A, Kainz J, Stammberger H, Auböck L and Beham-Schmid C.** Immunohistochemical and electron microscopical characterization of stromal cells in nasopharyngeal angiofibromas. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 254: 196-199, 1997
78. **Gramann M, Wendler O, Haeberle L and Schick B.** Prominent collagen type VI expression in juvenile angiofibromas. *Histochem Cell Biol* 131: 155-164, 2009
79. **Coutinho-Camillo CM, Brentani MM and Nagai MA.** Genetic alterations in juvenile nasopharyngeal angiofibromas. *Head Neck* 30: 390-400, 2008
80. **Chekenya M and Pilkington GJ.** NG2 precursor cells in neoplasia: functional, histogenesis and therapeutic implications for malignant brain tumours. *J Neurocytol* 31: 507-521, 2002
81. **Fabbro-Peray P, Zouaoui S, Darlix A, Fabbro M, Pallud J, Rigau V, Mathieu-Daude H, Bessaoud F, Bauchet F, Riondel A, Sorbets E, Charissoux M, Amelot A, Mandonnet E, Figarella-Branger D, Duffau H, Tretarre B, Taillandier L and Bauchet L.** Association of patterns of care, prognostic factors, and use of radiotherapy-temozolomide therapy with survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a French national population-based study. *J Neurooncol* 142: 91-101, 2019
82. **Koshy M, Villano JL, Dolecek TA, Howard A, Mahmood U, Chmura SJ, Weichselbaum RR and McCarthy BJ.** Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries. *J Neurooncol* 107: 207-212, 2012
83. **Grochans S, Cybulska AM, Simińska D, Korbecki J, Kojder K, Chlubek D and Baranowska-Bosiacka I.** Epidemiology of glioblastoma multiforme-literature review. *Cancers (Basel)* 14: 2412, 2022
84. **Gittleman H, Boscia A, Ostrom QT, Truitt G, Fritz Y, Kruchko C and Barnholtz-Sloan JS.** Survivorship in adults with malignant brain and other central nervous system tumor from 2000-2014. *Neuro Oncol* 20: vii6-vii16, 2018
85. **Hansen S, Rasmussen BK, Laursen RJ, Kosteljanetz M, Schultz H, Nørgård BM, Guldborg R and Gradel KO.** Treatment and survival of glioblastoma patients in Denmark: the Danish Neuro-Oncology Registry 2009-2014. *J Neurooncol* 139: 479-489, 2018

86. **Oronsky B, Reid TR, Oronsky A, Sandhu N and Knox SJ.** A review of newly diagnosed glioblastoma. *Front Oncol* 10: 574012, 2020
87. **Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, Soffietti R, von Deimling A and Ellison DW.** The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro Oncol* 23: 1231-1251, 2021
88. **Zhao B, Xia Y, Yang F, Wang Y, Wang Y, Wang Y, Dai C, Wang Y and Ma W.** Molecular landscape of IDH-mutant astrocytoma and oligodendroglioma grade 2 indicate tumor purity as an underlying genomic factor. *Mol Med* 28: 34, 2022
89. **Stewart J, Sahgal A, Chan AKM, Soliman H, Tseng CL, Detsky J, Myrehaug S, Atenafu EG, Helmi A, Perry J, Keith J, Jane Lim-Fat M, Munoz DG, Zadeh G, Shultz DB, Das S, Coolens C, Alcaide-Leon P and Maralani PJ.** Pattern of recurrence of glioblastoma versus grade 4 IDH-mutant astrocytoma following chemoradiation: a retrospective matched-cohort analysis. *Technol Cancer Res Treat* 21: 15330338221109650, 2022
90. **Brat DJ and Van Meir EG.** Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab Invest* 84: 397-405, 2004
91. **Codrici E, Enciu AM, Popescu ID, Mihai S and Tanase C.** Glioma stem cells and their microenvironments: providers of challenging therapeutic targets. *Stem Cells Int* 2016: 5728438, 2016
92. **Soubannier V and Stifani S.** NF- κ B signalling in glioblastoma. *Biomedicines* 5: 29, 2017
93. **Keunen O, Johansson M, Oudin A, Sanzey M, Rahim SA, Fack F, Thorsen F, Taxt T, Bartos M, Jirik R, Miletic H, Wang J, Stieber D, Stuhr L, Moen I, Rygh CB, Bjerkvig R and Niclou SP.** Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 3749-3754, 2011
94. **William D, Mokri P, Lamp N, Linnebacher M, Classen CF, Erbersdobler A and Schneider B.** Amplification of the EGFR gene can be maintained and modulated by variation of EGF concentrations in in vitro models of glioblastoma multiforme. *PLoS One* 12: e0185208, 2017
95. **Xiao A, Brenneman B, Floyd D, Comeau L, Spurio K, Olmez I, Lee J, Nakano I, Godlewski J, Bronisz A, Kagaya N, Shin-Ya K and Purow B.** Statins affect human glioblastoma and other cancers through TGF- β inhibition. *Oncotarget* 10: 1716-1728, 2019
96. **Li X, Wu C, Chen N, Gu H, Yen A, Cao L, Wang E and Wang L.** PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget* 7: 33440-33450, 2016
97. **Khabibov M, Garifullin A, Bumber Y, Khaddour K, Fernandez M, Khamitov F, Khalikova L, Kuznetsova N, Kit O and Kharin L.** Signaling pathways and therapeutic approaches in glioblastoma multiforme (Review). *Int J Oncol* 60: 69, 2022
98. **Noch EK, Ramakrishna R and Magge R.** Challenges in the treatment of glioblastoma: multisystem mechanisms of therapeutic resistance. *World Neurosurg* 116: 505-517, 2018

99. **Rong L, Li N and Zhang Z.** Emerging therapies for glioblastoma: current state and future directions. *J Exp Clin Cancer Res* 41: 142, 2022
100. **Rončević A, Koruga N, Soldo Koruga A, Rončević R, Rotim T, Šimundić T, Kretić D, Perić M, Turk T and Štimac D.** Personalized treatment of glioblastoma: current state and future perspective. *Biomedicines* 11: 1579, 2023
101. **Li J, Di C, Mattox AK, Wu L and Adamson DC.** The future role of personalized medicine in the treatment of glioblastoma multiforme. *Pharmgenomics Pers Med* 3: 111-127, 2010
102. **Chekenya M, Krakstad C, Svendsen A, Netland IA, Staalesen V, Tysnes BB, Selheim F, Wang J, Sakariassen P, Sandal T, Lønning PE, Flatmark T, Enger P, Bjerkvig R, Sioud M and Stallcup WB.** The progenitor cell marker NG2/MPG promotes chemoresistance by activation of integrin-dependent PI3K/Akt signaling. *Oncogene* 27: 5182-5194, 2008
103. **Svendsen A, Verhoeff JJ, Immervoll H, Brøgger JC, Kmiecik J, Poli A, Netland IA, Prestegarden L, Planagumà J, Torsvik A, Kjersem AB, Sakariassen P, Heggdal JI, Van Furth WR, Bjerkvig R, Lund-Johansen M, Enger P, Felsberg J, Brons NH, Tronstad KJ, Waha A and Chekenya M.** Expression of the progenitor marker NG2/CSPG4 predicts poor survival and resistance to ionising radiation in glioblastoma. *Acta Neuropathol* 122: 495-510, 2011
104. **Burg MA, Nishiyama A and Stallcup WB.** A central segment of the NG2 proteoglycan is critical for the ability of glioma cells to bind and migrate toward type VI collagen. *Exp Cell Res* 235: 254-264, 1997
105. **Diederichs S and Haber DA.** Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 131: 1097-1108, 2007
106. **Lytle JR, Yario TA and Steitz JA.** Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 9667-9672, 2007
107. **Horita M, Farquharson C and Stephen LA.** The role of miR-29 family in disease. *J Cell Biochem* 122: 696-715, 2021
108. **Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH and Kim VN.** MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23: 4051-4060, 2004
109. **O'Brien J, Hayder H, Zayed Y and Peng C.** Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9: 402, 2018
110. **Cullen BR.** Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell* 16: 861-865, 2004
111. **Zeng Y, Yi R and Cullen BR.** Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J* 24: 138-148, 2005
112. **Yi R, Qin Y, Macara IG and Cullen BR.** Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17: 3011-3016, 2003
113. **Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T and Zamore PD.** A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293: 834-838, 2001

114. **Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K and Shiekhattar R.** TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436: 740-744, 2005
115. **Pillai RS.** MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *Rna* 11: 1753-1761, 2005
116. **Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ and Parker R.** Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* 20: 515-524, 2006
117. **Kim YK and Kim VN.** Processing of intronic microRNAs. *EMBO J* 26: 775-783, 2007
118. **Broughton JP, Lovci MT, Huang JL, Yeo GW and Pasquinelli AE.** Pairing beyond the seed supports microRNA targeting specificity. *Mol Cell* 64: 320-333, 2016
119. **Chaluvally-Raghavan P, Jeong KJ, Pradeep S, Silva AM, Yu S, Liu W, Moss T, Rodriguez-Aguayo C, Zhang D, Ram P, Liu J, Lu Y, Lopez-Berestein G, Calin GA, Sood AK and Mills GB.** Direct upregulation of STAT3 by microRNA-551b-3p deregulates growth and metastasis of ovarian cancer. *Cell Rep* 15: 1493-1504, 2016
120. **Matsui M, Chu Y, Zhang H, Gagnon KT, Shaikh S, Kuchimanchi S, Manoharan M, Corey DR and Janowski BA.** Promoter RNA links transcriptional regulation of inflammatory pathway genes. *Nucleic Acids Res* 41: 10086-10109, 2013
121. **Smolarz B, Durczyński A, Romanowicz H, Szyłło K and Hogendorf P.** miRNAs in cancer (Review of literature). *Int J Mol Sci* 23: 2805, 2022
122. **Kwon JJ, Factora TD, Dey S and Kota J.** A systematic review of miR-29 in cancer. *Mol Ther Oncolytics* 12: 173-194, 2019
123. **Friedman RC, Farh KK, Burge CB and Bartel DP.** Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19: 92-105, 2009
124. **Croce CM.** Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 10: 704-714, 2009
125. **Chen D, Yang X, Liu M, Zhang Z and Xing E.** Roles of miRNA dysregulation in the pathogenesis of multiple myeloma. *Cancer Gene Ther* 28: 1256-1268, 2021
126. **Angelescu MA, Andronic O, Dima SO, Popescu I, Meivar-Levy I, Ferber S and Lixandru D.** miRNAs as biomarkers in diabetes: moving towards precision medicine. *Int J Mol Sci* 23, 2022
127. **Drury RE, O'Connor D and Pollard AJ.** The clinical application of microRNAs in infectious disease. *Front Immunol* 8: 1182, 2017
128. **Guévremont D, Roy J, Cutfield NJ and Williams JM.** MicroRNAs in Parkinson's disease: a systematic review and diagnostic accuracy meta-analysis. *Sci Rep* 13: 16272, 2023
129. **Turchinovich A, Samatov TR, Tonevitsky AG and Burwinkel B.** Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Front Genet* 4: 119, 2013
130. **Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, Suci N, Cretoiu SM and Voinea SC.** MiRNAs as biomarkers in disease: latest findings regarding their role in diagnosis and prognosis. *Cells* 9: 276, 2020

131. **Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ and Wang K.** The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 56: 1733-1741, 2010
132. **Lan H, Lu H, Wang X and Jin H.** MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges. *Biomed Res Int* 2015: 125094, 2015
133. **Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, Ding X and Liang M.** The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiol Genomics* 44: 237-244, 2012
134. **Dalgaard LT, Sørensen AE, Hardikar AA and Joglekar MV.** The microRNA-29 family: role in metabolism and metabolic disease. *Am J Physiol Cell Physiol* 323: C367-c377, 2022
135. **Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, Dang CV, Thomas-Tikhonenko A and Mendell JT.** Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet* 40: 43-50, 2008
136. **Eyholzer M, Schmid S, Wilkens L, Mueller BU and Pabst T.** The tumour-suppressive miR-29a/b1 cluster is regulated by CEBPA and blocked in human AML. *Br J Cancer* 103: 275-284, 2010
137. **Hwang HW, Wentzel EA and Mendell JT.** A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science* 315: 97-100, 2007
138. **Kriegel AJ, Terhune SS, Greene AS, Noon KR, Pereckas MS and Liang M.** Isomer-specific effect of microRNA miR-29b on nuclear morphology. *J Biol Chem* 293: 14080-14088, 2018
139. **Zhang Z, Zou J, Wang GK, Zhang JT, Huang S, Qin YW and Jing Q.** Uracils at nucleotide position 9-11 are required for the rapid turnover of miR-29 family. *Nucleic Acids Res* 39: 4387-4395, 2011
140. **Liang M.** MicroRNA: a new entrance to the broad paradigm of systems molecular medicine. *Physiol Genomics* 38: 113-115, 2009
141. **van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA and Olson EN.** Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 13027-13032, 2008
142. **Liu C, Li L, Ge M, Gu L, Wang M, Zhang K, Su Y, Zhang Y, Liu C, Lan M, Yu Y, Wang T, Li Q, Zhao Y, Yu Z, Li N and Meng Q.** Overexpression of miR-29 Leads to myopathy that resemble pathology of Ullrich congenital muscular dystrophy. *Cells* 8: 459, 2019
143. **Vanden Oever M, Muldoon D, Mathews W, McElmurry R and Tolar J.** MiR-29 regulates type VII collagen in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 136: 2013-2021, 2016
144. **Maurer B, Stanczyk J, Jüngel A, Akhmetshina A, Trenkmann M, Brock M, Kowal-Bielecka O, Gay RE, Michel BA, Distler JH, Gay S and Distler O.** MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 62: 1733-1743, 2010
145. **Sengupta S, den Boon JA, Chen IH, Newton MA, Stanhope SA, Cheng YJ, Chen CJ, Hildesheim A, Sugden B and Ahlquist P.** MicroRNA 29c is down-regulated in

- nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 5874-5878, 2008
146. **Koshizuka K, Kikkawa N, Hanazawa T, Yamada Y, Okato A, Arai T, Katada K, Okamoto Y and Seki N.** Inhibition of integrin β 1-mediated oncogenic signalling by the antitumor microRNA-29 family in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 9: 3663-3676, 2018
 147. **Cushing L, Kuang P and Lü J.** The role of miR-29 in pulmonary fibrosis. *Biochem Cell Biol* 93: 109-118, 2015
 148. **Papadopoulou AS, Dooley J, Linterman MA, Pierson W, Ucar O, Kyewski B, Zuklys S, Hollander GA, Matthys P, Gray DHD, De Strooper B and Liston A.** The thymic epithelial microRNA network elevates the threshold for infection-associated thymic involution via miR-29a mediated suppression of the IFN- α receptor. *Nature Immunol* 13: 181-187, 2012
 149. **Cushing L, Costinean S, Xu W, Jiang Z, Madden L, Kuang P, Huang J, Weisman A, Hata A, Croce CM and Lü J.** Disruption of miR-29 leads to aberrant differentiation of smooth muscle cells selectively associated with distal lung vasculature. *PLOS Genetics* 11: e1005238, 2015
 150. **Smith KM, Guerau-de-Arellano M, Costinean S, Williams JL, Bottoni A, Mavrikis Cox G, Satoskar AR, Croce CM, Racke MK, Lovett-Racke AE and Whitacre CC.** miR-29ab1 deficiency identifies a negative feedback loop controlling Th1 bias that is dysregulated in multiple sclerosis. *J Immunol* 189: 1567-1576, 2012
 151. **Han YC, Park CY, Bhagat G, Zhang J, Wang Y, Fan JB, Liu M, Zou Y, Weissman IL and Gu H.** MicroRNA-29a induces aberrant self-renewal capacity in hematopoietic progenitors, biased myeloid development, and acute myeloid leukemia. *J Exp Med* 207: 475-489, 2010
 152. **Nguyen T, Kuo C, Nicholl MB, Sim MS, Turner RR, Morton DL and Hoon DS.** Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma. *Epigenetics* 6: 388-394, 2011
 153. **Grassilli S, Bertagnolo V and Brugnoli F.** MiR-29b in breast cancer: a promising target for therapeutic approaches. *Diagnostics (Basel)* 12: 2139, 2022
 154. **Leng Y, Chen Z, Ding H, Zhao X, Qin L and Pan Y.** Overexpression of microRNA-29b inhibits epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis of colorectal cancer through the ETV4/ERK/EGFR axis. *Cancer Cell Int* 21: 17, 2021
 155. **Yan B, Guo Q, Fu FJ, Wang Z, Yin Z, Wei YB and Yang JR.** The role of miR-29b in cancer: regulation, function, and signaling. *Onco Targets Ther* 8: 539-548, 2015
 156. **Chou J, Lin JH, Brenot A, Kim JW, Provot S and Werb Z.** GATA3 suppresses metastasis and modulates the tumour microenvironment by regulating microRNA-29b expression. *Nat Cell Biol* 15: 201-213, 2013
 157. **Steele R, Mott JL and Ray RB.** MBP-1 upregulates miR-29b that represses Mcl-1, collagens, and matrix-metalloproteinase-2 in prostate cancer cells. *Genes Cancer* 1: 381-387, 2010
 158. **Kinoshita T, Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, Yamamoto N, Yoshino H, Itesako T, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y and Seki N.** Tumour-suppressive microRNA-

- 29s inhibit cancer cell migration and invasion by targeting laminin-integrin signalling in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 109: 2636-2645, 2013
159. **Dong H, Luo L, Hong S, Siu H, Xiao Y, Jin L, Chen R and Xiong M.** Integrated analysis of mutations, miRNA and mRNA expression in glioblastoma. *BMC Syst Biol* 4: 163, 2010
160. **Cortez MA, Nicoloso MS, Shimizu M, Rossi S, Gopisetty G, Molina JR, Carlotti C, Jr., Tirapelli D, Neder L, Brassesco MS, Scrideli CA, Tone LG, Georgescu MM, Zhang W, Puduvalli V and Calin GA.** MiR-29b and miR-125a regulate podoplanin and suppress invasion in glioblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 49: 981-990, 2010
161. **Shin J, Shim HG, Hwang T, Kim H, Kang SH, Dho YS, Park SH, Kim SJ and Park CK.** Restoration of miR-29b exerts anti-cancer effects on glioblastoma. *Cancer Cell Int* 17: 104, 2017
162. **Møller HG, Rasmussen AP, Andersen HH, Johnsen KB, Henriksen M and Duroux M.** A systematic review of microRNA in glioblastoma multiforme: micro-modulators in the mesenchymal mode of migration and invasion. *Mol Neurobiol* 47: 131-144, 2013
163. **Boewe AS.** Regulatorische Faktoren der Nerve/gliale Antigen (NG)2 Genexpression. *Masterarbeit, Universität des Saarlandes*, 2019
164. **Schultheiss CS, Laggai S, Czepukojc B, Hussein UK, List M, Barghash A, Tierling S, Hosseini K, Golob-Schwarzl N, Pokorny J, Hachenthal N, Schulz M, Helms V, Walter J, Zimmer V, Lammert F, Bohle RM, Dandolo L, Haybaeck J, Kiemer AK and Kessler SM.** The long non-coding RNA H19 suppresses carcinogenesis and chemoresistance in hepatocellular carcinoma. *Cell Stress* 1: 37-54, 2017
165. **Ricci MS, Jin Z, Dews M, Yu D, Thomas-Tikhonenko A, Dicker DT and El-Deiry WS.** Direct repression of FLIP expression by c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity. *Mol Cell Biol* 24: 8541-8555, 2004
166. **Al-Sarraj A, Day RM and Thiel G.** Specificity of transcriptional regulation by the zinc finger transcription factors Sp1, Sp3, and Egr-1. *J Cell Biochem* 94: 153-167, 2005
167. **Heiss M, Hellström M, Kalén M, May T, Weber H, Hecker M, Augustin HG and Korff T.** Endothelial cell spheroids as a versatile tool to study angiogenesis in vitro. *FASEB J* 29: 3076-3084, 2015
168. **Agarwal V, Bell GW, Nam J-W and Bartel DP.** Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* 4: e05005, 2015
169. **Wang X, Wang Y, Yu L, Sakakura K, Visus C, Schwab JH, Ferrone CR, Favoino E, Koya Y, Campoli MR, McCarthy JB, DeLeo AB and Ferrone S.** CSPG4 in cancer: multiple roles. *Curr Mol Med* 10: 419-429, 2010
170. **Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS and Dixit VM.** Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81: 801-809, 1995
171. **Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE and Poirier GG.** Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53: 3976-3985, 1993

172. **Stallcup WB, Dahlin K and Healy P.** Interaction of the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan with type VI collagen. *J Cell Biol* 111: 3177-3188, 1990
173. **Burg MA, Tillet E, Timpl R and Stallcup WB.** Binding of the NG2 proteoglycan to type VI collagen and other extracellular matrix molecules. *J Biol Chem* 271: 26110-26116, 1996
174. **S C, Nicolosi PA, Braghetta P, Pazzaglia L, Benassi MS, Picci P, Lacrima K, Zanocco D, Rizzo E, Stallcup WB, Colombatti A and Perris R.** NG2/CSPG4-collagen type VI interplays putatively involved in the microenvironmental control of tumour engraftment and local expansion. *J Mol Cell Biol* 5: 176-193, 2013
175. **Fang X, Burg MA, Barritt D, Dahlin-Huppe K, Nishiyama A and Stallcup WB.** Cytoskeletal reorganization induced by engagement of the NG2 proteoglycan leads to cell spreading and migration. *Mol Biol Cell* 10: 3373-3387, 1999
176. **Vinci M, Box C, Zimmermann M and Eccles SA.** Tumor spheroid-based migration assays for evaluation of therapeutic agents. *Methods Mol Biol* 986: 253-266, 2013
177. **Chekenya M, Rooprai HK, Davies D, Levine JM, Butt AM and Pilkington GJ.** The NG2 chondroitin sulfate proteoglycan: role in malignant progression of human brain tumours. *Int J Dev Neurosci* 17: 421-435, 1999
178. **Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C and Schultz N.** The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2: 401-404, 2012
179. **Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C and Schultz N.** Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 6: p11, 2013
180. **de Bruijn I, Kundra R, Mastrogiacomo B, Tran TN, Sikina L, Mazor T, Li X, Ochoa A, Zhao G, Lai B, Abeshouse A, Baiceanu D, Ciftci E, Dogrusoz U, Duffile A, Erkoç Z, Garcia Lara E, Fu Z, Gross B, Haynes C, Heath A, Higgins D, Jagannathan P, Kalletla K, Kumari P, Lindsay J, Lisman A, Leenknecht B, Lukasse P, Madela D, Madupuri R, van Nierop P, Plantalech O, Quach J, Resnick AC, Rodenburg SYA, Satravada BA, Schaeffer F, Sheridan R, Singh J, Sirohi R, Sumer SO, van Hagen S, Wang A, Wilson M, Zhang H, Zhu K, Rusk N, Brown S, Lavery JA, Panageas KS, Rudolph JE, LeNoue-Newton ML, Warner JL, Guo X, Hunter-Zinck H, Yu TV, Pilai S, Nichols C, Gardos SM, Philip J, Kehl KL, Riely GJ, Schrag D, Lee J, Fiandalo MV, Sweeney SM, Pugh TJ, Sander C, Cerami E, Gao J and Schultz N.** Analysis and visualization of longitudinal genomic and clinical data from the AACR project GENIE biopharma collaborative in cBioPortal. *Cancer Res* 83: 3861-3867, 2023
181. **Garzon R, Liu S, Fabbri M, Liu Z, Heaphy CE, Callegari E, Schwind S, Pang J, Yu J, Muthusamy N, Havelange V, Volinia S, Blum W, Rush LJ, Perrotti D, Andreeff M, Bloomfield CD, Byrd JC, Chan K, Wu LC, Croce CM and Marcucci G.** MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood* 113: 6411-6418, 2009
182. **Riew TR, Jin X, Kim S, Kim HL and Lee MY.** Temporal dynamics of cells expressing NG2 and platelet-derived growth factor receptor- β in the fibrotic scar formation after 3-nitropropionic acid-induced acute brain injury. *Cell Tissue Res* 385: 539-555, 2021

183. **Morita S, Hourai A and Miyata S.** Changes in pericytic expression of NG2 and PDGFRB and vascular permeability in the sensory circumventricular organs of adult mouse by osmotic stimulation. *Cell Biochem Funct* 32: 51-61, 2014
184. **Sekiya Y, Ogawa T, Yoshizato K, Ikeda K and Kawada N.** Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b. *Biochem Biophys Res Commun* 412: 74-79, 2011
185. **Wang J, Chu ES, Chen HY, Man K, Go MY, Huang XR, Lan HY, Sung JJ and Yu J.** MicroRNA-29b prevents liver fibrosis by attenuating hepatic stellate cell activation and inducing apoptosis through targeting PI3K/AKT pathway. *Oncotarget* 6: 7325-7338, 2015
186. **Lane R, Cilibrasi C, Chen J, Shah K, Messuti E, Mazarakis NK, Stebbing J, Critchley G, Song E, Simon T and Giamas G.** PDGF-R inhibition induces glioblastoma cell differentiation via DUSP1/p38MAPK signalling. *Oncogene* 41: 2749-2763, 2022
187. **Hong JD, Wang X, Peng YP, Peng JH, Wang J, Dong YP, He D, Peng ZZ, Tu QS, Sheng LF, Zhong MZ and Duan CJ.** Silencing platelet-derived growth factor receptor- β enhances the radiosensitivity of C6 glioma cells in vitro and in vivo. *Oncol Lett* 14: 329-336, 2017
188. **You WK, Yotsumoto F, Sakimura K, Adams RH and Stallcup WB.** NG2 proteoglycan promotes tumor vascularization via integrin-dependent effects on pericyte function. *Angiogenesis* 17: 61-76, 2014
189. **Xia T, Dong S and Tian J.** MiR-29b promotes the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue via the PTEN/AKT/ β -catenin signaling pathway. *Int J Mol Med* 46: 709-717, 2020
190. **Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R and Yamada KM.** Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 280: 1614-1617, 1998
191. **Tamura M, Gu J, Danen EHJ, Takino T, Miyamoto S and Yamada KM.** PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival Pathway. *J Biol Chem* 274: 20693-20703, 1999
192. **Haddadi N, Lin Y, Travis G, Simpson AM, Nassif NT and McGowan EM.** PTEN/PTENP1: 'Regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/Akt signalling', new targets for cancer therapy. *Mol Cancer* 17: 37, 2018
193. **Song MS, Salmena L and Pandolfi PP.** The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 283-296, 2012
194. **Zhang LL, Liu J, Lei S, Zhang J, Zhou W and Yu HG.** PTEN inhibits the invasion and metastasis of gastric cancer via downregulation of FAK expression. *Cell Signal* 26: 1011-1020, 2014
195. **Cui L, Li Y, Lv X, Li J, Wang X, Lei Z and Li X.** Expression of microRNA-301a and its functional roles in malignant melanoma. *Cell Physiol Biochem* 40: 230-244, 2016
196. **Egawa H, Jingushi K, Hirono T, Ueda Y, Kitae K, Nakata W, Fujita K, Uemura M, Nonomura N and Tsujikawa K.** The miR-130 family promotes cell migration and

- invasion in bladder cancer through FAK and Akt phosphorylation by regulating PTEN. *Sci Rep* 6: 20574, 2016
197. **Grako KA, Ochiya T, Barritt D, Nishiyama A and Stallcup WB.** PDGF (alpha)-receptor is unresponsive to PDGF-AA in aortic smooth muscle cells from the NG2 knockout mouse. *J Cell Sci* 112: 905-915, 1999
198. **Tang Y, He R, An J, Deng P, Huang L and Yang W.** The effect of H19-miR-29b interaction on bleomycin-induced mouse model of idiopathic pulmonary fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 479: 417-423, 2016
199. **Wang G, Lin X, Han H, Zhang H, Li X, Feng M and Jiang C.** LncRNA H19 promotes glioblastoma multiforme development by activating autophagy by sponging miR-491-5p. *Bioengineered* 13: 11440-11455, 2022
200. **Fazi B, Garbo S, Toschi N, Mangiola A, Lombardi M, Sicari D, Battistelli C, Galardi S, Michienzi A, Trevisi G, Harari-Steinfeld R, Cicchini C and Ciafrè SA.** The lncRNA H19 positively affects the tumorigenic properties of glioblastoma cells and contributes to NKD1 repression through the recruitment of EZH2 on its promoter. *Oncotarget* 9: 15512-15525, 2018
201. **Jiang P, Wang P, Sun X, Yuan Z, Zhan R, Ma X and Li W.** Knockdown of long noncoding RNA H19 sensitizes human glioma cells to temozolomide therapy. *Onco Targets Ther* 9: 3501-3509, 2016
202. **Herms JW, von Loewenich FD, Behnke J, Markakis E and Kretschmar HA.** C-Myc oncogene family expression in glioblastoma and survival. *Surg Neurol* 51: 536-542, 1999
203. **Annibali D, Whitfield JR, Favuzzi E, Jauset T, Serrano E, Cuartas I, Redondo-Campos S, Folch G, González-Juncà A, Sodir NM, Massó-Vallés D, Beaulieu M-E, Swigart LB, Mc Gee MM, Somma MP, Nasi S, Seoane J, Evan GI and Soucek L.** Myc inhibition is effective against glioma and reveals a role for Myc in proficient mitosis. *Nat Commun* 5: 4632, 2014
204. **Zhang E, Li W, Yin D, De W, Zhu L, Sun S and Han L.** C-Myc-regulated long non-coding RNA H19 indicates a poor prognosis and affects cell proliferation in non-small-cell lung cancer. *Tumour Biol* 37: 4007-4015, 2016
205. **Barsyte-Lovejoy D, Lau SK, Boutros PC, Khosravi F, Jurisica I, Andrulis IL, Tsao MS and Penn LZ.** The c-Myc oncogene directly induces the H19 noncoding RNA by allele-specific binding to potentiate tumorigenesis. *Cancer Res* 66: 5330-5337, 2006
206. **Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM and Hayes DN.** Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17: 98-110, 2010
207. **Deng X, Das S, Kaur H, Wilson E, Camphausen K and Shankavaram U.** Glioma-BioDP: database for visualization of molecular profiles to improve prognosis of brain cancer. *BMC Medical Genomics* 16: 168, 2023

208. **Celiku O, Johnson S, Zhao S, Camphausen K and Shankavaram U.** Visualizing molecular profiles of glioblastoma with GBM-BioDP. *PLoS One* 9: e101239, 2014
209. **Burg MA, Grako KA and Stallcup WB.** Expression of the NG2 proteoglycan enhances the growth and metastatic properties of melanoma cells. *J Cell Physiol* 177: 299-312, 1998
210. **Tsidulko AY, Kazanskaya GM, Kostromskaya DV, Aidagulova SV, Kiselev RS, Volkov AM, Kobozev VV, Gaitan AS, Krivoshapkin AL and Grigorieva EV.** Prognostic relevance of NG2/CSPG4, CD44 and Ki-67 in patients with glioblastoma. *Tumour Biol* 39: 1010428317724282, 2017
211. **Hsu NC, Nien P-Y, Yokoyama KK, Chu P-Y and Hou M-F.** High chondroitin sulfate proteoglycan 4 expression correlates with poor outcome in patients with breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 441: 514-518, 2013
212. **Rivera Z, Ferrone S, Wang X, Jube S, Yang H, Pass HI, Kanodia S, Gaudino G and Carbone M.** CSPG4 as a target of antibody-based immunotherapy for malignant mesothelioma. *Clin Cancer Res* 18: 5352-5363, 2012
213. **Yin H and Flynn AD.** Drugging membrane protein interactions. *Annu Rev Biomed Eng* 18: 51-76, 2016
214. **Ghose T, Ferrone S, Blair AH, Kralovec Y, Temponi M, Singh M and Mammen M.** Regression of human melanoma xenografts in nude mice injected with methotrexate linked to monoclonal antibody 225.28 to human high molecular weight-melanoma associated antigen. *Cancer Immunol Immunother* 34: 90-96, 1991
215. **Hafner C, Breiteneder H, Ferrone S, Thallinger C, Wagner S, Schmidt WM, Jasinska J, Kundi M, Wolff K, Zielinski CC, Scheiner O, Wiedermann U and Pehamberger H.** Suppression of human melanoma tumor growth in SCID mice by a human high molecular weight-melanoma associated antigen (HMW-MAA) specific monoclonal antibody. *Int J Cancer* 114: 426-432, 2005
216. **Ilieva KM, Cheung A, Mele S, Chiaruttini G, Crescioli S, Griffin M, Nakamura M, Spicer JF, Tsoka S, Lacy KE, Tutt ANJ and Karagiannis SN.** Chondroitin sulfate proteoglycan 4 and its potential as an antibody immunotherapy target across different tumor types. *Front Immunol* 8: 1911, 2017
217. **Rolih V, Barutello G, Iussich S, De Maria R, Quaglino E, Buracco P, Cavallo F and Riccardo F.** CSPG4: a prototype oncoantigen for translational immunotherapy studies. *J Transl Med* 15: 151, 2017
218. **Mittelman A, Chen ZJ, Yang H, Wong GY and Ferrone S.** Human high molecular weight melanoma-associated antigen (HMW-MAA) mimicry by mouse anti-idiotypic monoclonal antibody MK2-23: induction of humoral anti-HMW-MAA immunity and prolongation of survival in patients with stage IV melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 466-470, 1992
219. **Toritsu-Itakura H, Schoellhammer HF, Sim MS, Irie RF, Hausmann S, Raum T, Baeuerle PA and Morton DL.** Redirected lysis of human melanoma cells by a MCSP/CD3-bispecific BiTE antibody that engages patient-derived T cells. *J Immunother* 34: 597-605, 2011
220. **Geldres C, Savoldo B, Hoyos V, Caruana I, Zhang M, Yvon E, Del Vecchio M, Creighton CJ, Ittmann M, Ferrone S and Dotti G.** T lymphocytes redirected against

- the chondroitin sulfate proteoglycan-4 control the growth of multiple solid tumors both in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 20: 962-971, 2014
221. **Allen BJ, Singla AA, Rizvi SM, Graham P, Bruchertseifer F, Apostolidis C and Morgenstern A.** Analysis of patient survival in a phase I trial of systemic targeted α -therapy for metastatic melanoma. *Immunotherapy* 3: 1041-1050, 2011
222. **Kasten BB, Oliver PG, Kim H, Fan J, Ferrone S, Zinn KR and Buchsbaum DJ.** (212)Pb-labeled antibody 225.28 targeted to chondroitin sulfate proteoglycan 4 for triple-negative breast cancer therapy in mouse models. *Int J Mol Sci* 19: 925, 2018
223. **Waldman AD, Fritz JM and Lenardo MJ.** A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol* 20: 651-668, 2020
224. **Crittenden MR, Zebertavage L, Kramer G, Bambina S, Friedman D, Troesch V, Blair T, Baird JR, Alice A and Gough MJ.** Tumor cure by radiation therapy and checkpoint inhibitors depends on pre-existing immunity. *Sci Rep* 8: 7012, 2018
225. **Pombo Antunes AR, Scheyltjens I, Duerinck J, Neyns B, Movahedi K and Van Ginderachter JA.** Understanding the glioblastoma immune microenvironment as basis for the development of new immunotherapeutic strategies. *Elife* 9: e52176, 2020
226. **Rocha Pinheiro SL, Lemos FFB, Marques HS, Silva Luz M, de Oliveira Silva LG, Faria Souza Mendes Dos Santos C, da Costa Evangelista K, Calmon MS, Sande Loureiro M and Freire de Melo F.** Immunotherapy in glioblastoma treatment: current state and future prospects. *World J Clin Oncol* 14: 138-159, 2023
227. **Schick B, Pillong L, Wenzel G and Wemmert S.** Neural crest stem cells in juvenile angiofibromas. *Int J Mol Sci* 23: 1932, 2022
228. **Ribeiro ST, Tesio M, Ribot JC, Macintyre E, Barata JT and Silva-Santos B.** Casein kinase 2 controls the survival of normal thymic and leukemic $\gamma\delta$ T cells via promotion of AKT signaling. *Leukemia* 31: 1603-1610, 2017
229. **Siddiqui-Jain A, Drygin D, Streiner N, Chua P, Pierre F, O'Brien SE, Bliesath J, Omori M, Huser N, Ho C, Proffitt C, Schwaebe MK, Ryckman DM, Rice WG and Anderes K.** CX-4945, an orally bioavailable selective inhibitor of protein kinase CK2, inhibits prosurvival and angiogenic signaling and exhibits antitumor efficacy. *Cancer Res* 70: 10288-10298, 2010
230. **Battistutta R, Cozza G, Pierre F, Papinutto E, Lolli G, Sarno S, O'Brien SE, Siddiqui-Jain A, Haddach M, Anderes K, Ryckman DM, Meggio F and Pinna LA.** Unprecedented selectivity and structural determinants of a new class of protein kinase CK2 inhibitors in clinical trials for the treatment of cancer. *Biochemistry* 50: 8478-8488, 2011
231. **Lee JY, Yun JS, Kim WK, Chun HS, Jin H, Cho S and Chang JH.** Structural basis for the selective inhibition of Cdc2-like kinases by CX-4945. *Biomed Res Int* 2019: 6125068, 2019
232. **Grygier P, Pustelny K, Nowak J, Golik P, Popowicz GM, Plettenburg O, Dubin G, Menezes F and Czarna A.** Silmitasertib (CX-4945), a clinically used CK2-kinase inhibitor with additional effects on GSK3 β and DYRK1A kinases: a structural perspective. *J Med Chem* 66: 4009-4024, 2023

233. **Menyhart D, Gyenis L, Jurcic K, Roffey SE, Puri A, Jovanovic P, Szkop KJ, Pittock P, Lajoie G, Axtman AD, Larsson O, Topisirovic I and Litchfield DW.** Comparison of CX-4945 and SGC-CK2-1 as inhibitors of CSNK2 using quantitative phosphoproteomics: triple SILAC in combination with inhibitor-resistant CSNK2. *Curr Res Chem Biol* 3: 100041, 2023
234. **Iyengar P, Espina V, Williams TW, Lin Y, Berry D, Jelicks LA, Lee H, Temple K, Graves R, Pollard J, Chopra N, Russell RG, Sasisekharan R, Trock BJ, Lippman M, Calvert VS, Petricoin EF, 3rd, Liotta L, Dadachova E, Pestell RG, Lisanti MP, Bonaldo P and Scherer PE.** Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. *J Clin Invest* 115: 1163-1176, 2005
235. **Heino J.** The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix Biol* 19: 319-323, 2000
236. **Ozerdem U and Stallcup WB.** Pathological angiogenesis is reduced by targeting pericytes via the NG2 proteoglycan. *Angiogenesis* 7: 269-276, 2004
237. **Cattaruzza S, Ozerdem U, Denzel M, Ranscht B, Bulian P, Cavallaro U, Zanicco D, Colombatti A, Stallcup WB and Perris R.** Multivalent proteoglycan modulation of FGF mitogenic responses in perivascular cells. *Angiogenesis* 16: 309-327, 2013
238. **Mottet D, Ruys SP, Demazy C, Raes M and Michiels C.** Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity. *Int J Cancer* 117: 764-774, 2005
239. **Pucko EB and Ostrowski RP.** Inhibiting CK2 among promising therapeutic strategies for gliomas and several other neoplasms. *Pharmaceutics* 14: 331, 2022
240. **D'Amore C, Borgo C, Sarno S and Salvi M.** Role of CK2 inhibitor CX-4945 in anti-cancer combination therapy - potential clinical relevance. *Cell Oncol* 43: 1003-1016, 2020
241. **Ruzzene M, Penzo D and Pinna LA.** Protein kinase CK2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) induces apoptosis and caspase-dependent degradation of haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) in Jurkat cells. *Biochem J* 364: 41-47, 2002
242. **Al-Mayhani MT, Grenfell R, Narita M, Piccirillo S, Kenney-Herbert E, Fawcett JW, Collins VP, Ichimura K and Watts C.** NG2 expression in glioblastoma identifies an actively proliferating population with an aggressive molecular signature. *Neuro Oncol* 13: 830-845, 2011
243. **Al-Mayhani TF, Heywood RM, Vemireddy V, Lathia JD, Piccirillo SGM and Watts C.** A non-hierarchical organization of tumorigenic NG2 cells in glioblastoma promoted by EGFR. *Neuro Oncol* 21: 719-729, 2019
244. **Bai Z, Qu Y, Shi L, Li X, Yang Z, Ji M and Hou P.** Identification of a germline CSPG4 variation in a family with neurofibromatosis type 1-like phenotype. *Cell Death Dis* 12: 765, 2021
245. **Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM and Farace MG.** Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 334: 1351-1358, 2005

246. **Chan JA, Krichevsky AM and Kosik KS.** MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 65: 6029-6033, 2005
247. **Xu JX, Yang Y, Zhang X and Luan XP.** Micro-RNA29b enhances the sensitivity of glioblastoma multiforme cells to temozolomide by promoting autophagy. *Anat Rec (Hoboken)* 304: 342-352, 2021
248. **Xu L, Xu Y, Jing Z, Wang X, Zha X, Zeng C, Chen S, Yang L, Luo G, Li B and Li Y.** Altered expression pattern of miR-29a, miR-29b and the target genes in myeloid leukemia. *Exp Hematol Oncol* 3: 17, 2014
249. **Guan H, Cai J, Zhang N, Wu J, Yuan J, Li J and Li M.** Sp1 is upregulated in human glioma, promotes MMP-2-mediated cell invasion and predicts poor clinical outcome. *Int J Cancer* 130: 593-601, 2012
250. **Liu L, Yang S, Lin K, Yu X, Meng J, Ma C, Wu Z, Hao Y, Chen N, Ge Q, Gao W, Wang X, Lam EWF, Zhang L, Li F, Jin B and Jin D.** Sp1 induced gene TIMP1 is related to immune cell infiltration in glioblastoma. *Sci Rep* 12: 11181, 2022
251. **Higa N, Akahane T, Yokoyama S, Yonezawa H, Uchida H, Takajo T, Otsuji R, Hamada T, Matsuo K, Kirishima M, Hata N, Hanaya R, Tanimoto A and Yoshimoto K.** Prognostic impact of PDGFRA gain/amplification and MGMT promoter methylation status in patients with IDH wild-type glioblastoma. *Neurooncol Adv* 4: vdac097, 2022
252. **Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Nouseh H, Salama SR, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH, Beroukhi R, Bernard B, Wu CJ, Genovese G, Shmulevich I, Barnholtz-Sloan J, Zou L, Vegesna R, Shukla SA, Ciriello G, Yung WK, Zhang W, Sougnez C, Mikkelsen T, Aldape K, Bigner DD, Van Meir EG, Prados M, Sloan A, Black KL, Eschbacher J, Finocchiaro G, Friedman W, Andrews DW, Guha A, Iacocca M, O'Neill BP, Foltz G, Myers J, Weisenberger DJ, Penny R, Kucherlapati R, Perou CM, Hayes DN, Gibbs R, Marra M, Mills GB, Lander E, Spellman P, Wilson R, Sander C, Weinstein J, Meyerson M, Gabriel S, Laird PW, Haussler D, Getz G and Chin L.** The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155: 462-477, 2013
253. **Yang J, Price MA, Neudauer CL, Wilson C, Ferrone S, Xia H, Iida J, Simpson MA and McCarthy JB.** Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan enhances FAK and ERK activation by distinct mechanisms. *J Cell Biol* 165: 881-891, 2004
254. **Barnes JM, Kaushik S, Bainer RO, Sa JK, Woods EC, Kai F, Przybyla L, Lee M, Lee HW, Tung JC, Maller O, Barrett AS, Lu KV, Lakins JN, Hansen KC, Obernier K, Alvarez-Buylla A, Bergers G, Phillips JJ, Nam DH, Bertozzi CR and Weaver VM.** A tension-mediated glycoalyx-integrin feedback loop promotes mesenchymal-like glioblastoma. *Nat Cell Biol* 20: 1203-1214, 2018
255. **Maehama T and Dixon JE.** The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 273: 13375-13378, 1998
256. **Georgescu MM.** PTEN tumor suppressor network in PI3K-AKT pathway control. *Genes Cancer* 1: 1170-1177, 2010
257. **deGraffenried LA, Fulcher L, Friedrichs WE, Grünwald V, Ray RB and Hidalgo M.** Reduced PTEN expression in breast cancer cells confers susceptibility to inhibitors of the PI3 kinase/Akt pathway. *Ann Oncol* 15: 1510-1516, 2004

258. **Luo J, Manning BD and Cantley LC.** Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* 4: 257-262, 2003
259. **Chung HJ, Choi YE, Kim ES, Han YH, Park MJ and Bae IH.** MiR-29b attenuates tumorigenicity and stemness maintenance in human glioblastoma multiforme by directly targeting BCL2L2. *Oncotarget* 6: 18429-18444, 2015
260. **Yang J, Price MA, Li GY, Bar-Eli M, Salgia R, Jagedeeswaran R, Carlson JH, Ferrone S, Turley EA and McCarthy JB.** Melanoma proteoglycan modifies gene expression to stimulate tumor cell motility, growth, and epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Res* 69: 7538-7547, 2009
261. **Zhang A, Guo Z, Ren JX, Chen H, Yang W, Zhou Y, Pan L, Chen Z, Ren F, Chen Y, Zhang M, Peng F, Chen W, Wang X, Zhang Z and Wu H.** Development of an MCL-1-related prognostic signature and inhibitors screening for glioblastoma. *Front Pharmacol* 14: 1162540, 2023
262. **Sancho M, Leiva D, Lucendo E and Orzáez M.** Understanding MCL1: from cellular function and regulation to pharmacological inhibition. *FEBS J* 289: 6209-6234, 2022
263. **Aldaz B, Sagardoy A, Nogueira L, Guruceaga E, Grande L, Huse JT, Aznar MA, Díez-Valle R, Tejada-Solís S, Alonso MM, Fernandez-Luna JL, Martinez-Climent JA and Malumbres R.** Involvement of miRNAs in the differentiation of human glioblastoma multiforme stem-like cells. *PLoS One* 8: e77098, 2013
264. **Shi C, Ren L, Sun C, Yu L, Bian X, Zhou X, Wen Y, Hua D, Zhao S, Luo W, Wang R, Rao C, Wang Q and Yu S.** MiR-29a/b/c function as invasion suppressors for gliomas by targeting CDC42 and predict the prognosis of patients. *Br J Cancer* 117: 1036-1047, 2017
265. **Shi C, Luo W, Sun C, Yu L, Zhou X, Hua D, Jiang Z, Wang Q and Yu S.** The miR-29 family members induce glioblastoma cell apoptosis by targeting cell division cycle 42 in a p53-dependent manner. *Eur J Clin Invest* 53: e13964, 2023
266. **Xu B, Jiang C, Han H, Liu H, Tang M, Liu L, Ji W, Lu X, Yang X, Zhang Y and Liu Y.** Icaritin inhibits the invasion and epithelial-to-mesenchymal transition of glioblastoma cells by targeting EMMPRIN via PTEN/Akt/HIF-1 α signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 42: 1296-1307, 2015
267. **Qian X, Li X, Shi Z, Xia Y, Cai Q, Xu D, Tan L, Du L, Zheng Y, Zhao D, Zhang C, Lorenzi PL, You Y, Jiang BH, Jiang T, Li H and Lu Z.** PTEN suppresses glycolysis by dephosphorylating and inhibiting autophosphorylated PGK1. *Mol Cell* 76: 516-527.e517, 2019
268. **Paskeh MDA, Ghadyani F, Hashemi M, Abbaspour A, Zabolian A, Javanshir S, Razzazan M, Mirzaei S, Entezari M, Goharrizi M, Salimimoghadam S, Aref AR, Kalbasi A, Rajabi R, Rashidi M, Taheriazam A and Sethi G.** Biological impact and therapeutic perspective of targeting PI3K/Akt signaling in hepatocellular carcinoma: promises and challenges. *Pharmacol Res* 187: 106553, 2023
269. **Hashemi M, Etemad S, Rezaei S, Ziaolhagh S, Rajabi R, Rahmanian P, Abdi S, Koochpar ZK, Rafiei R, Raei B, Ahmadi F, Salimimoghadam S, Aref AR, Zandieh MA, Entezari M, Taheriazam A and Hushmandi K.** Progress in targeting PTEN/PI3K/Akt axis in glioblastoma therapy: revisiting molecular interactions. *Biomed Pharmacother* 158: 114204, 2023

270. **Hu S, Hu H, Wang R, He H and Shui H.** MicroRNA-29b prevents renal fibrosis by attenuating renal tubular epithelial cell-mesenchymal transition through targeting the PI3K/AKT pathway. *Int Urol Nephrol* 53: 1941-1950, 2021
271. **Shi C, Rao C, Sun C, Yu L, Zhou X, Hua D, Wang R, Luo W, Jiang Z, Zhou J, Wang Q and Yu S.** MiR-29s function as tumor suppressors in gliomas by targeting TRAF4 and predict patient prognosis. *Cell Death & Disease* 9: 1078, 2018
272. **Zhang Y and Tycko B.** Monoallelic expression of the human H19 gene. *Nat Genet* 1: 40-44, 1992
273. **Goshen R, Rachmilewitz J, Schneider T, de-Groot N, Ariel I, Palti Z and Hochberg AA.** The expression of the H-19 and IGF-2 genes during human embryogenesis and placental development. *Mol Reprod Dev* 34: 374-379, 1993
274. **Alipoor B, Parvar SN, Sabati Z, Ghaedi H and Ghasemi H.** An updated review of the H19 lncRNA in human cancer: molecular mechanism and diagnostic and therapeutic importance. *Mol Biol Rep* 47: 6357-6374, 2020
275. **Ariel I, Ayesch S, Perlman EJ, Pizov G, Tanos V, Schneider T, Erdmann VA, Podeh D, Komitowski D, Quasem AS, de Groot N and Hochberg A.** The product of the imprinted H19 gene is an oncofetal RNA. *Mol Pathol* 50: 34-44, 1997
276. **Dey BK, Pfeifer K and Dutta A.** The H19 long noncoding RNA gives rise to microRNAs miR-675-3p and miR-675-5p to promote skeletal muscle differentiation and regeneration. *Genes Dev* 28: 491-501, 2014
277. **Li A, Mallik S, Luo H, Jia P, Lee DF and Zhao Z.** H19, a long non-coding RNA, mediates transcription factors and target genes through interference of microRNAs in pan-cancer. *Mol Ther Nucleic Acids* 21: 180-191, 2020
278. **Yang J, Qi M, Fei X, Wang X and Wang K.** LncRNA H19: A novel oncogene in multiple cancers. *Int J Biol Sci* 17: 3188-3208, 2021
279. **Jiang X, Yan Y, Hu M, Chen X, Wang Y, Dai Y, Wu D, Wang Y, Zhuang Z and Xia H.** Increased level of H19 long noncoding RNA promotes invasion, angiogenesis, and stemness of glioblastoma cells. *J Neurosurg* 2016: 129-136, 2016
280. **Lv M, Zhong Z, Huang M, Tian Q, Jiang R and Chen J.** LncRNA H19 regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis of bladder cancer by miR-29b-3p as competing endogenous RNA. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864: 1887-1899, 2017
281. **Zheng H, Ying H, Yan H, Kimmelman AC, Hiller DJ, Chen AJ, Perry SR, Tonon G, Chu GC, Ding Z, Stommel JM, Dunn KL, Wiedemeyer R, You MJ, Brennan C, Wang YA, Ligon KL, Wong WH, Chin L and dePinho RA.** PTEN and p53 converge on c-Myc to control differentiation, self-renewal, and transformation of normal and neoplastic stem cells in glioblastoma. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73: 427-437, 2008
282. **Wang J, Wang H, Li Z, Wu Q, Lathia JD, McLendon RE, Hjelmeland AB and Rich JN.** C-Myc is required for maintenance of glioma cancer stem cells. *PLoS One* 3: e3769, 2008

283. **Zhao K, Wang Q, Wang Y, Huang K, Yang C, Li Y, Yi K and Kang C.** EGFR/c-myc axis regulates TGF β /Hippo/Notch pathway via epigenetic silencing miR-524 in gliomas. *Cancer Lett* 406: 12-21, 2017
284. **Luo H, Chen Z, Wang S, Zhang R, Qiu W, Zhao L, Peng C, Xu R, Chen W, Wang HW, Chen Y, Yang J, Zhang X, Zhang S, Chen D, Wu W, Zhao C, Cheng G, Jiang T, Lu D, You Y, Liu N and Wang H.** C-Myc-miR-29c-REV3L signalling pathway drives the acquisition of temozolomide resistance in glioblastoma. *Brain* 138: 3654-3672, 2015
285. **Xu Q, Ahmed AK, Zhu Y, Wang K, Lv S, Li Y and Jiang Y.** Oncogenic microRNA-20a is downregulated by the HIF-1 α /c-MYC pathway in IDH1 R132H-mutant glioma. *Biochem Biophys Res Commun* 499: 882-888, 2018
286. **Barsyte-Lovejoy D, Lau SK, Boutros PC, Khosravi F, Jurisica I, Andrulis IL, Tsao MS and Penn LZ.** The c-Myc oncogene directly induces the H19 noncoding RNA by allele-specific binding to potentiate tumorigenesis. *Cancer Res* 66: 5330-5337, 2006
287. **Zhang X, Zhao X, Fiskus W, Lin J, Lwin T, Rao R, Zhang Y, Chan JC, Fu K, Marquez VE, Chen-Kiang S, Moscinski LC, Seto E, Dalton WS, Wright KL, Sotomayor E, Bhalla K and Tao J.** Retraction notice to: coordinated silencing of MYC-mediated miR-29 by HDAC3 and EZH2 as a therapeutic target of histone modification in aggressive B-cell lymphomas. *Cancer Cell* 41: 1198, 2023
288. **Sampath D, Liu C, Vasan K, Sulda M, Pudevalli VK, Wierda WG and Keating MJ.** Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 119: 1162-1172, 2012
289. **Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L, deCarvalho AC, Lyu S, Li P, Li Y, Barthel F, Cho HJ, Lin YH, Satani N, Martinez-Ledesma E, Zheng S, Chang E, Sauv e CG, Olar A, Lan ZD, Finocchiaro G, Phillips JJ, Berger MS, Gabrusiewicz KR, Wang G, Eskilsson E, Hu J, Mikkelsen T, DePinho RA, Muller F, Heimberger AB, Sulman EP, Nam DH and Verhaak RGW.** Tumor evolution of glioma-intrinsic gene expression subtypes associates with immunological changes in the microenvironment. *Cancer Cell* 32: 42-56.e46, 2017
290. **Steponaitis G, Kucinskas V, Golubickaite I, Skauminas K and Saudargiene A.** Glioblastoma molecular classification tool based on mRNA analysis: from wet-lab to subtype. *Int J Mol Sci* 23: 15875, 2022
291. **Liu Y, Shi N, Regev A, He S and Hemann MT.** Integrated regulatory models for inference of subtype-specific susceptibilities in glioblastoma. *Mol Syst Biol* 16: e9506, 2020
292. **Dong N, Xu B and Xu J.** EGF-mediated overexpression of Myc attenuates miR-26b by recruiting HDAC3 to induce epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells. *Biomed Res Int* 2018: 7148023, 2018
293. **Bhowmick NA, Zent R, Ghiassi M, McDonnell M and Moses HL.** Integrin beta 1 signaling is necessary for transforming growth factor-beta activation of p38MAPK and epithelial plasticity. *J Biol Chem* 276: 46707-46713, 2001
294. **Steller EJ, Raats DA, Koster J, Rutten B, Govaert KM, Emmink BL, Snoeren N, van Hooff SR, Holstege FC, Maas C, Borel Rinkes IH and Kranenburg O.** PDGFRB promotes liver metastasis formation of mesenchymal-like colorectal tumor cells. *Neoplasia* 15: 204-217, 2013

-
295. **Zhu P, Du XL, Lu G and Zhu JJ.** Survival benefit of glioblastoma patients after FDA approval of temozolomide concomitant with radiation and bevacizumab: A population-based study. *Oncotarget* 8: 44015-44031, 2017
296. **van Solinge TS, Nieland L, Chiocca EA and Broekman MLD.** Advances in local therapy for glioblastoma — taking the fight to the tumour. *Nat Rev Neurol* 18: 221-236, 2022
297. **Erfurt C, Müller E, Emmerling S, Klotz C, Hertl M, Schuler G and Schultz ES.** Melanoma-associated chondroitin sulphate proteoglycan as a new target antigen for CD4+ T cells in melanoma patients. *Int J Cancer* 124: 2341-2346, 2009
298. **Bergmann N, Delbridge C, Gempt J, Feuchtinger A, Walch A, Schirmer L, Bunk W, Aschenbrenner T, Liesche-Starnecker F and Schlegel J.** The intratumoral heterogeneity reflects the intertumoral subtypes of glioblastoma multiforme: a regional immunohistochemistry analysis. *Front Oncol* 10: 494, 2020
299. **Shen SH, Woroniecka K, Barbour AB, Fecci PE, Sanchez-Perez L and Sampson JH.** CAR T cells and checkpoint inhibition for the treatment of glioblastoma. *Expert Opin Biol Ther* 20: 579-591, 2020
300. **Morimoto T, Nakazawa T, Maeoka R, Nakagawa I, Tsujimura T and Matsuda R.** Natural killer cell-based immunotherapy against glioblastoma. *Int J Mol Sci* 24: 2111, 2023
301. **Nafee N and Gouda N.** Nucleic acids-based nanotherapeutics crossing the blood brain barrier. *Curr Gene Ther* 17: 154-169, 2017
302. **Chakroun RW, Zhang P, Lin R, Schiapparelli P, Quinones-Hinojosa A and Cui H.** Nanotherapeutic systems for local treatment of brain tumors. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol* 10: e1479, 2018
303. **Jiménez-Morales JM, Hernández-Cuenca YE, Reyes-Abrahantes A, Ruiz-García H, Barajas-Olmos F, García-Ortiz H, Orozco L, Quiñones-Hinojosa A, Reyes-González J and Abrahantes-Pérez MdC.** MicroRNA delivery systems in glioma therapy and perspectives: A systematic review. *J Control Release* 349: 712-730, 2022

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. M. D. Menger und Herrn Prof. Dr. M. W. Laschke für die Möglichkeit zur Promotion am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie sowie für die Zurverfügungstellung aller zugehörigen Materialien und Geräte bedanken.

Vor allem möchte ich Herrn Prof. Dr. M. W. Laschke für die regelmäßige Unterstützung und Hilfestellung im wissenschaftlichen Schreiben und Präsentieren sowie der Korrektur der vorliegenden Arbeit als Gutachter und Doktorvater danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Emmanuel Ampofo, der mich sowohl während meiner Masterarbeit als auch während der Promotion immer bestärkt hat. Ich möchte mich für das stets offene Ohr, für die Unterstützung bei Fragestellungen und die regelmäßigen Diskussionen und Anregungen bei komplexen Problemen bedanken. Als erster Ansprechpartner habe ich von ihm während der gemeinsamen Jahre nicht nur unglaublich viel über das wissenschaftliche Arbeiten im Labor gelernt, sondern auch die sinnvolle und effiziente Projektplanung, das Präsentieren von Projekten sowie das Schreiben von Publikationen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Prof. Dr. Claudia Götz und Herrn Prof. Dr. Mathias Montenarh, die mir die Nutzung der Geräte und Materialien in der Medizinischen Biochemie und Molekularbiologie ermöglichten sowie mich jederzeit mit ihrem kompetenten Rat unterstützt haben.

Frau Dr. Silke Wemmert und Herrn Prof. Dr. Bernhard Schick aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde danke ich für die Bereitstellung der primären juvenilen Angiofibrom-Proben und die angenehme und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Caroline Bickelmann für ihre Unterstützung bei der Durchflusszytometrie, der Western Blot-Analyse und Zellkultur bedanken. Auch bei Frau Ruth Nickels möchte ich mich für ihre Unterstützung bei der Durchflusszytometrie und bei Frau Christina Marx für die Hilfe bei der Zellkultur bedanken. Neben der experimentellen Unterstützung möchte ich mich bei den bereits genannten sowie bei Dr. Jeanette Rudzitis-Auth, Dr. Vivien Becker, Dr. Lisa Nalbach, Dr. Yuan Gu, Dr. Beate Schmitt, Janine Becker, Sandra Hans, Helena Simon, Mandy Pack und Selina Wrublewsky für ihre stetige Hilfsbereitschaft und die gemeinsame Zusammenarbeit über die letzten Jahre bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die während meiner Promotion immer für mich da waren.

10 Publikationen

10.1 Originalarbeiten dieser Dissertation

Boewe AS, Wemmert S, Kulas P, Schick B, Götz C, Wrublewsky S, Montenarh M, Menger MD, Laschke MW and Ampofo E. Inhibition of CK2 reduces NG2 expression in juvenile angiofibroma. *Biomedicines* 10: 966, 2022

Boewe AS, Wrublewsky S, Hoppstädter J, Götz C, Kiemer AK, Menger MD, Laschke MW and Ampofo E. C-Myc/H19/miR-29b axis downregulates nerve/glial (NG)2 expression in glioblastoma multiforme. *Mol Ther Nucleic Acids* 35: 102120, 2024

10.2 Weitere Originalarbeiten

Schmitt BM, **Boewe AS**, Becker V, Nalbach L, Gu Y, Götz C, Menger MD, Laschke MW and Ampofo E. Protein kinase CK2 regulates nerve/glial antigen (NG)2-mediated angiogenic activity of human pericytes. *Cells* 9: 1546, 2020

Schmitt BM, **Boewe AS**, Götz C, Philipp SE, Urbschat S, Oertel J, Menger MD, Laschke MW and Ampofo E. CK2 activity mediates the aggressive molecular signature of glioblastoma multiforme by inducing nerve/glial antigen (NG)2 expression. *Cancers (Basel)* 13: 1678, 2021

Wrublewsky S, Speer T, Nalbach L, **Boewe AS**, Pack M, Alansary D, Roma LP, Hoffmann MDA, Schmitt BM, Weinzierl A, Menger MD, Laschke MW and Ampofo E. Targeting pancreatic islet NLRP3 improves islet graft revascularization. *Diabetes* 71: 1706-1720, 2022

Frueh FS, Gassert L, Scheuer C, Müller A, Fries P, **Boewe AS**, Ampofo E, Rube CE, Menger MD and Laschke MW. Adipose tissue-derived microvascular fragments promote lymphangiogenesis in a murine lymphedema model. *J Tissue Eng* 13: 20417314221109957, 2022

Pack M, Gulde TN, Völcker MV, **Boewe AS**, Wrublewsky S, Ampofo E, Montenarh M and Götz C. Protein kinase CK2 contributes to glucose homeostasis by targeting fructose-1,6-bisphosphatase 1. *Int J Mol Sci* 21: 428, 2022

Becker V, Yuan X, **Boewe AS**, Ampofo E, Ebert E, Hohneck J, Bohle RM, Meese E, Zhao Y, Menger MD, Laschke MW and Gu Y. Hypoxia-induced downregulation of microRNA-186-5p in endothelial cells promotes non-small cell lung cancer angiogenesis by upregulating protein kinase C alpha. *Mol Ther Nucleic Acids* 31: 421-436, 2023

10.3 Zitierfähige Abstracts

Boewe AS, Schmitt BM, Gu Y, Sippl C, Urbschat S, Oertel J, Menger MD, Laschke MW and Ampofo E. Nerve/gliial antigen (NG)2 expression in glioblastoma is regulated by miR-29b-3p. *Eur Surg Res* 60: 165, 2019

Vortrag auf den 23. Chirurgischen Forschungstagen 2019 in Aachen

10.4 Nichtzitierfähige Abstracts

Boewe AS, Wrublewsky S, Menger MD, Laschke MW and Ampofo E. Die miR-29b, ein neuer Regulator der NG2-Expression im Glioblastom.

Vortrag auf den 25. Chirurgischen Forschungstagen 2022 in Freiburg

Boewe AS, Rumler H, Aichele D, Ampofo E, Götz C and Jose J. Temozolomide and TF – an appropriate combination of drugs for the treatment of glioblastoma?

Vortrag auf den 27. Chirurgischen Forschungstagen 2024 in Tübingen

11 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.