

**Aberrante DNA-Methylierung von
microRNA-Genen in präneoplastischen
Leberzellschädigungen und
hepatozellulären Karzinomen**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Cord Albat

geboren am 24.08.1978 in Hameln

2010

Referent: Prof. Dr. Ulrich Lehmann-Mühlenhoff

Korreferent: Prof. Dr. Helge Küster

Tag der Promotion: 20.05.2010

Zusammenfassung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Analyse von epigenetischen Modifikationen in malignen Neoplasien, wobei im Besonderen die aberrante DNA-Methylierung von microRNA-Genen im hepatozellulären Karzinom und in dessen präneoplastischen Vorstufen betrachtet wird. MicroRNAs sind eine neue Gruppe von kleinen, 16-22nt langen Moleküle, die eine wichtige Rolle bei der posttranskriptionellen Regulation proteincodierender Gene spielen. Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist die weltweit vierthäufigste krebsassoziierte Todesursache, wobei die wichtigsten mit dem HCC assoziierten Faktoren, chronische Hepatitis B und C Infektionen, insgesamt etwa 480 Millionen Menschen betreffen.

In einer initialen *in silico* Analyse wurden alle bekannten microRNAs (n=463) auf CpG-Insel-Assoziation untersucht (Stand März 2007). Die Methylierung aller CpG-Insel-assoziierten microRNAs (n=68) wurden mittels COBRA in drei HCC-Zelllinien und gesunder Leber als Kontrolle gemessen. Die aus eigenen Ergebnissen und publizierten Daten ermittelten dreizehn microRNA-Kandidaten wurden daraufhin in einer quantitativen Analyse in verschiedenen Tumoren und deren angrenzenden Normalgeweben sowie präneoplastischen und gesunden Geweben als Kontrollen untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig ein umfassendes Methylierungsprofil von microRNA-Genen im hepatozellulären Karzinom und dessen präneoplastischen Vorstufen mittels Pyrosequenzierung erstellt. Es wurde die Methylierung von dreizehn CpG-Insel-assoziierten microRNAs in 49 HCC-Primärtumoren, 17 FLC-Primärtumoren und 20 Leberadenomen sowie in deren angrenzenden, nicht-neoplastischen Geweben gemessen. Weiterhin wurden 10 fokal noduläre Hyperplasien, 18 Leberzirrhosen, 20 Siderosen und 20 Proben gesundes Lebergewebe als nicht-neoplastische Kontrollgruppen untersucht. Hierbei wurden vier tumorspezifisch signifikant differentiell hypermethylierte microRNAs (Hsa-mir-9-1, Hsa-mir-9-2, Hsa-mir-9-3 und Hsa-mir-663) entdeckt. Bei dem Vergleich mehrerer gebräuchlicher Methoden zur Methylierungsanalyse erwies sich die Pyrosequenzierung als die mit Abstand beste Methode, mit deren Hilfe es möglich war, geringe Unterschiede im Methylierungsmuster von microRNA Genen zu erfassen und statistisch auszuwerten.

Ferner wurden die verfügbaren Regulations- und Expressionsdaten zu den untersuchten microRNA-Kandidaten zusammengefasst, um ein detailliertes Bild der genomischen Organisation dieser microRNA-Gene zu erstellen.

Im Kontext der *in silico* microRNA-Zielgenvorhersage wurde eine neue Methode etabliert, die eine bessere Vorhersage als die zur Zeit frei zugänglichen Programme ermöglicht.

Schlagworte: Methylierung, microRNA, hepatozelluläres Karzinom

Abstract

In this thesis, the emphasis is on the analysis of epigenetic alterations in malignant neoplasms. Thereby, we focused on the aberrant DNA-methylation of microRNA-genes in hepatocellular carcinoma and its pre-neoplastic preliminary stages. MicroRNAs are a novel class of small, 16-22nt long molecules which play a significant role in post-transcriptional regulation of protein-coding genes. The fourth most common cancer-associated cause of death worldwide, the hepatocellular carcinoma (HCC), is mainly caused by chronic Hepatitis B and C infections affecting about 480 million people.

In an initial *in silico* analysis all known microRNA's (n=463) were screened for CpG-island association (State: March 2007). Methylation levels of all CpG-island associated microRNA's (n=68) were measured via COBRA in three HCC cell lines and healthy liver as a control. Thirteen microRNA-candidates ascertained from our results and published data were thus analyzed in a quantitative screening in different tumors and their adjacent normal tissues as well as pre-neoplastic and healthy tissues as controls.

For the first time in this study we established a comprehensive methylation-profile of microRNA-genes in hepatocellular carcinoma and its pre-neoplastic preliminary stages using the pyrosequencing technique. Methylation levels of thirteen CpG-island-associated microRNAs were analyzed in 49 HCC primary tumors, 17 FLC primary tumors, and 20 liver adenomas along with their adjacent non-neoplastic tissues, respectively. We furthermore measured methylation levels of 10 samples of focal nodular hyperplasia, 18 samples of liver cirrhosis, 20 samples of haemochromatosis and 20 normal liver tissue samples as non-neoplastic controls. At this juncture we discovered four, in a tumor specific manner, significantly differentially hypermethylated microRNA's (Hsa-mir-9-1, Hsa-mir-9-2, Hsa-mir-9-3, and Hsa-mir-663). Compromising several common methods for methylation analysis, pyrosequencing proved to be the most accurate method by far, thus enabling us to detect marginal differences in the methylation pattern of microRNA-genes as well as providing quantitative data for statistical analyses.

We furthermore combined all available regulation- and expression data of the microRNA's studied in this thesis in a display to create a detailed data set regarding the genomic organization of these genes.

At the *in silico* microRNA-target prediction, we established a novel method, thus enabling a better prediction of microRNA targets compared to the public domain programs currently available.

Keywords: methylation, microRNA, hepatocellular carcinoma

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	2
Abstract	3
Inhaltsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	11
Abkürzungsverzeichnis	13
1 Einleitung	16
1.1 Anatomie und Funktionen der Leber.....	16
1.2 Krebserkrankungen des Menschen	17
1.3 Das hepatozelluläre Karzinom (HCC).....	17
1.3.1 Klinik und Behandlung des HCC.....	20
1.4 Epigenetik - stabil vererbare Veränderungen der Genexpression	20
1.5 Fibrolamelläre Karzinome, Leberadenome, fokal noduläre Hyperplasien und Siderosen	23
1.6 microRNAs - eine neue Gruppe kleiner, regulatorischer RNAs	23
1.7 Untersuchtes Patientenmaterial.....	26
1.8 Methylierungsanalyse von genomischer DNA.....	27
1.8.1 Quantitative Methylierungsanalysen	28
1.9 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	30
2 Material	32
2.1 Puffer, Kits und Chemikalien	32
2.2 Geräte	36
2.3 Gewebe und Zelllinien	38
2.3.1 Patientenmaterial.....	38
2.3.2 Zelllinien	38
2.4 Nukleinsäureextraktionen	39
2.4.1 DNA und RNA aus Patientenmaterial	39
2.4.2 DNA und RNA aus Zelllinien.....	40
2.4.3 Konversion von genomischer DNA zur Methylierungsanalyse	40
2.5 Oligonukleotide.....	40
2.5.1 Primer und Sonden.....	40
3 Methoden	45

3.1	Molekularbiologische Methoden	45
3.1.1	Nukleinsäureextraktion aus Kryomaterial	45
3.1.1.1	Mikrotomschnitte der Kryoproben	45
3.1.1.2	Nukleinsäureextraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	45
3.1.1.3	DNA-Extraktion aus Kryomaterial	46
3.1.1.4	RNA-Extraktion aus Kryomaterial und Zelllinien	47
3.1.2	Nukleinsäureextraktion aus FFPE-Material	48
3.1.2.1	DNA-Extraktion aus formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe	48
3.1.2.2	RNA-Extraktion aus formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe	49
3.1.3	Gesamt-RNA cDNA-Synthese	50
3.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	52
3.1.4.1	Gradienten-PCR zur Optimierung der Annealing-Temperatur von Primern	52
3.1.4.2	Methylierungsinsensitive PCR (iPCR) für COBRA	53
3.1.4.3	Methylierungsinsensitive PCR (iPCR) für Pyrosequenzierungen	55
3.1.4.4	Methylierungsspezifische PCR (MSP)	55
3.1.4.5	PCR zur Kontrolle der Klonierungseffizienz (M13-PCR)	57
3.1.5	DNA-Methylierungsanalysen	58
3.1.5.1	Natriumbisulfit-Konversion mit dem EZ DNA-Methylation Kit	58
3.1.5.2	Methylierungsspezifischer Restriktionsverdau (COBRA)	59
3.1.5.3	Pyrosequenzierung zur Methylierungsanalyse	60
3.1.6	Gelelektrophorese	62
3.1.6.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	62
3.1.6.2	Agarose-Gelelektrophorese	63
3.1.6.3	Denaturierende Agarosegelelektrophorese für RNA	64
3.1.7	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	66
3.1.8	Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)	67
3.1.8.1	Quantitative Real-Time PCR mit Hydrolysesonden zur Qualitätskontrolle (β -Actin-Test)	67
3.1.8.2	Quantitative Real Time-MSP mit SYBR Green (Methylight-PCR)	68
3.1.8.3	Quantitative Real-Time PCR mit TaqMan® MicroRNA Assays	70
3.1.9	Primärtranskript- und Promotoranalysen	72
3.1.9.1	Nested-PCR zur Identifizierung von microRNA-Primärtranskripten	72
3.1.9.2	Modifiziertes 5'-RACE Protokoll für GC-reiche microRNAs	74
3.1.10	Klonierung der RACE-Produkte in chemisch kompetente <i>E.coli</i>	78
3.1.10.1	Vorbereitungen für die Klonierung	78
3.1.10.2	Hitzeschock-Transformation von chemisch kompetenten TOP10	79
3.1.10.3	<i>E.coli</i> TOP10 Übernachtkulturen	80
3.1.10.4	Plasmidpräparation der TOPO-Vektoren	80
3.1.11	DNA-Sequenzierung der TOPO-Vektoren mit RACE-Produkt-Insert	81
3.2	Bioinformatische Methoden	82
3.2.1	<i>In silico</i> Sequenzanalysen	82
3.2.1.1	Untersuchung der microRNA-Kandidaten auf konservierte Sequenzabschnitte, putative Promotorregionen und CpG-Insel-Assoziation	82
3.2.1.2	Grafische Sequenzanalysen, Plasmid-Vektoranalysen und Alignments	86
3.2.2	Primerdesign	86
3.2.3	Statistische Datenauswertung und Datenbankerstellung	87

3.2.4	microRNA-Zielgenvorhersage.....	87
3.2.4.1	Vergleich verschiedener microRNA-Zielgen-Vorhersageprogramme	87
3.2.4.2	Eine neue Methode zur microRNA-Zielgen-Vorhersage	89
3.2.4.3	<i>In Silico</i> Analyse der validierten Targets der Kandidaten-microRNAs	90
3.2.5	MicroRNA-Expressionsdaten anhand der Datenbank <i>mirZ</i>	91
3.2.6	GO Clustering mit <i>DAVID 2008</i>	91
3.2.7	Genomische und regulatorische microRNA-Datenbank.....	92
4	Ergebnisse	93
4.1	Strategie zur Auffindung aberrant methylierter microRNAs.....	93
4.2	Molekularbiologische Analysen.....	96
4.2.1	Methylierungsanalysen von CpG-Insel assoziierten microRNAs.....	96
4.2.1.1	Semiquantitative Methylierungsanalyse (COBRA)	96
4.2.1.2	Qualitative Methylierungsanalyse (MSP)	100
4.2.1.3	Quantitative Methylierungsanalyse (Pyrosequenzierung)	101
4.2.1.4	Statistische Analyse der paarweisen Tumor- und angrenzenden, nicht-neoplastischem Gewebeproben	113
4.2.1.5	Statistische Analyse der einzelnen nicht-neoplastischem Gewebeproben	118
4.2.1.6	Semiquantitative Methylierungsanalyse (qRT-MSP)	119
4.2.1.7	Zusammenfassung der Methylierungsanalysen.....	121
4.2.2	Korrelationsanalysen ätiologisch relevanter Faktoren.....	125
4.2.2.1	Untersuchung von CpG-Island Methylator Phenotypes	125
4.2.2.2	Korrelation von Alter und Methylierung	127
4.2.3	Promotoranalysen von CpG-Insel assoziierten microRNAs	127
4.2.3.1	5'-RACE des Primärtranskripts von Hsa-mir-9-1	127
4.2.3.2	5'-RACE von Hsa-mir-9-1 mit Primern laut <i>First Exon Finder</i> -Vorhersage	128
4.2.3.3	Nested cDNA-PCR Hsa-mir-9-1	130
4.2.3.4	Expressionsanalysen von CpG-Insel assoziierten microRNAs.....	132
4.2.3.5	Zusammenfassung der Expressionsanalysen.....	135
4.3	Bioinformatische Analysen	136
4.3.1	MicroRNA-Expressionsprofile anhand der Datenbank <i>mirZ</i>	136
4.3.2	Regulation und Konservierung der Kandidanten-microRNAs.....	137
4.3.2.1	Sequenzanalysen basierend auf dem UCSC Genome Browser, WWW Promoter Scan sowie CpG-Island Searcher und CpGplot.....	137
4.3.3	Biologische Funktion der microRNA-Kandidaten	140
4.3.3.1	Validierte Zielgene der microRNA-Kandidaten.....	140
4.3.4	Bioinformatische Vorhersage von microRNA-Zielgenen	141
4.3.4.1	Evaluation von microRNA-Zielgen-Vorhersage-Algorithmen.....	141
4.3.4.2	Eine neue Methode der microRNA-Zielgenvorhersage	144
4.3.5	Genontologie-Kategorisierung der putativen Zielgene der microRNA-Kandidaten	148
4.3.5.1	Krebspezifische putative Zielgene der microRNA-Kandidaten	149
4.3.6	Genomische und regulatorische microRNA-Datenbank.....	150
5	Diskussion	152
5.1	Methylierungsanalysen von CpG-Insel assoziierten microRNAs.....	152

5.1.1	Methylierung von microRNAs in der Literatur	152
5.1.2	Regulation und Funktion von microRNAs	154
5.1.3	Methylierung von microRNAs im HCC in der Literatur	155
5.1.4	Qualitative Methylierungsanalyse (MSP)	158
5.1.5	Semiquantitative Methylierungsanalysen (COBRA und qRT-MSP).....	158
5.1.6	Quantitative Methylierungsanalyse (Pyrosequenzierung)	160
5.1.6.1	Statistische Analyse der microRNA-Methylierungsdaten	162
5.1.7	Korrelationsanalysen ätiologisch relevanter Faktoren.....	166
5.1.7.1	CpG-Island Methylator Phenotypes (CIMP) und Alterseffekt	166
5.2	Promotoranalysen von CpG-Insel assoziierten microRNAs	168
5.2.1	5'-RACE und Nested cDNA-PCR von Hsa-mir-9-1	168
5.3	Expressionsanalyse von CpG-Insel assoziierten microRNAs	169
5.3.1	Expressionsanalyse der microRNA-Kandidaten	170
5.3.1.1	Expressionsanalyse von Hsa-mir-1 und Hsa-mir-9	170
5.3.1.2	microRNA-Expressionsprofile anhand der Datenbank <i>mirZ</i>	171
5.4	Regulation und Konservierung der microRNA-Kandidaten	171
5.4.1	Sequenzanalysen basierend auf dem UCSC Genome Browser, WWW Promoter Scan sowie CpG-Island Searcher und CpGplot	171
5.5	Biologische Funktion der microRNAs	173
5.5.1	Funktion und validierte Zielgene der microRNA-Kandidaten.....	173
5.6	Bioinformatische Vorhersage von microRNA-Zielgenen	177
5.6.1	Evaluation von microRNA-Zielgen-Vorhersage-Algorithmen.....	177
5.6.2	Eine neue Methode der microRNA-Zielgenvorhersage.....	178
5.7	Genontologie-Kategorisierung der microRNA-Zielgene	179
5.7.1	Krebsspezifische putative Zielgene der microRNA-Kandidaten	179
	Anhang A: Sequenzanalysen der microRNA-Kandidaten	180
	Anhang B: GO-Kategorisierung der Zielgene der microRNA-Kandidaten	191
	Literaturverzeichnis	195
	Danksagung.....	206
	Lebenslauf	207
	Publikationen.....	208
	Erklärung zur Dissertation.....	209

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Mikroskopische Struktur der menschlichen Leber.....	16
Abbildung 2 HCC31 Tumor (links) mit angrenzendem, nekrotischen Lebergewebe (rechts).....	18
Abbildung 3 Schema der Hepatokarzinogenese.....	19
Abbildung 4 Methylierung des menschlichen Genoms.....	21
Abbildung 5 Epigenetische Regulation von microRNA-Genen.....	22
Abbildung 6 Schema des microRNA-Pathway.....	25
Abbildung 7 Schema der Bisulfitkonversion und Amplifikation durch PCR.....	27
Abbildung 8 Schematische Darstellung der Pyrosequenzierung.....	28
Abbildung 9 Beispiel eines Pyrogramms.....	29
Abbildung 10 iPCR-Produkt und Restriktionsfragmente von Hsa-mir-659.....	96
Abbildung 11 Methylierungsgrad von 68 CpG-Insel assoziierten microRNAs.....	97
Abbildung 12 Methylierungsgrad von 12 differentiell methylierten microRNAs.....	98
Abbildung 13 Methylierungsgrad von 12 differentiell methylierten microRNAs.....	99
Abbildung 14 Methylierungsspezifische PCR (MSP) von Hsa-mir-34a.....	100
Abbildung 15 Zusammenfassung der Methylierungsdaten der microRNA- Kandidaten aus COBRA und MSP-Analysen.....	101
Abbildung 16 iPCR für die Pyrosequenzierung von Hsa-mir-9-1.....	102
Abbildung 17 Pyrogramme der microRNA Hsa-mir-9-1.....	102
Abbildung 18 Methylierung von Hsa-mir-1-1.....	103
Abbildung 19 Methylierung von Hsa-mir-9-1.....	104
Abbildung 20 Methylierung von Hsa-mir-9-2.....	105
Abbildung 21 Methylierung von Hsa-mir-9-3.....	106
Abbildung 22 Methylierung von Hsa-mir-34a.....	107
Abbildung 23 Methylierung von Hsa-mir-124-1.....	107
Abbildung 24 Methylierung von Hsa-mir-124-2.....	108
Abbildung 25 Methylierung von Hsa-mir-124-3.....	109
Abbildung 26 Methylierung von Hsa-mir-148a.....	110
Abbildung 27 Methylierung von Hsa-mir-596.....	110
Abbildung 28 Methylierung von Hsa-mir-663.....	111
Abbildung 29 Methylierung der microRNA-Kandidaten in HCC-Zelllinien.....	112
Abbildung 30 Methylierungsgrad der microRNA-Kandidaten der einzelnen Fälle.....	115
Abbildung 31 Methylierungsgrad der microRNA-Kandidaten der einzelnen Fälle.....	116
Abbildung 32 Methylierungsgrad der microRNA-Kandidaten der einzelnen Fälle.....	117
Abbildung 33 Methylierungsgrad der microRNA-Kandidaten der einzelnen Fälle.....	118
Abbildung 34 Methylierungsgrad der microRNA-Kandidaten der einzelnen Fälle.....	119
Abbildung 35 Titrationskurve der qRT-MSP (MethyLight-PCR).....	120
Abbildung 36 qRT-MSP von Hsa-mir-34b/c mit allen Kohorten.....	120
Abbildung 37 5'-RACE mir-9-1 optimiert für GC-reiche Zielsequenzen.....	128

Abbildung 38 Lage der 5'-RACE-Primer und genomischer Kontext von Hsa-mir-9-1.	129
Abbildung 39 5'-RACE Hsa-mir-9-1 laut Lujambio et al. und FirstEF-Primerdesign. ...	129
Abbildung 40 Primerlokalisierung der Nested-PCR Hsa-mir-9-1.	130
Abbildung 41 Nested-PCR von Hsa-mir-9-1 (Primärtranskript I).	130
Abbildung 42 Nested-PCR von Hsa-mir-9-1 (Primärtranskript II).	131
Abbildung 43 Nested-PCR von Hsa-mir-9-1 (Primärtranskript III).	131
Abbildung 44 Methylierung und Expression von Hsa-mir-1 in 13 Zelllinien.	132
Abbildung 45 Methylierung und Expression von Hsa-mir-1 in Patientenmaterial.	133
Abbildung 46 Methylierung und Expression von Hsa-mir-9 in vier Zelllinien.	134
Abbildung 47 Methylierung und Expression von Hsa-mir-9 in Patientenmaterial.	135
Abbildung 48 Expression der microRNA-Kandidaten.	136
Abbildung 49 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-mir-9-1.	138
Abbildung 50 Experimentell validierte Zielgene der microRNA-Kandidaten.	140
Abbildung 51 Anzahl der Algorithmen, die ein Zielgen von Hsa-mir-1 vorhersagen konnten.	142
Abbildung 52 Vergleich von Sensitivität und Spezifität der sieben microRNA-Zielgen-Vorhersageprogramme.	143
Abbildung 53 Auswertung der microRNA-Zielgen-Vorhersage nach CA am Beispiel Hsa-mir-124.	144
Abbildung 54 Auswertung der microRNA-Zielgen-Vorhersage nach CA am Beispiel Hsa-mir-1.	145
Abbildung 55 Auswertung der microRNA-Zielgen-Vorhersage nach CA am Beispiel Hsa-mir-16.	145
Abbildung 56 Auswertung der microRNA-Zielgen-Vorhersage nach CA am Beispiel Hsa-mir-125b.	146
Abbildung 57 Putative Zielgene der microRNA-Kandidaten.	147
Abbildung 58 Verteilung des <i>Enrichment Score</i> der Stoffwechselwege der putativen Zielgene von Hsa-mir-9.	149
Abbildung 59 Informationsdateien der microRNA-Datenbank.	151
Abbildung 60 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-mir-1-1.	180
Abbildung 61 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-mir-9-2.	181
Abbildung 62 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-mir-9-3.	182
Abbildung 63 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-mir-34a.	183
Abbildung 64 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-mir-34b/c.	184
Abbildung 65 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-mir-124-1.	185
Abbildung 66 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-mir-124-2.	186
Abbildung 67 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-mir-124-3.	187
Abbildung 68 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-mir-148a.	188
Abbildung 69 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-mir-596.	189
Abbildung 70 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-mir-663.	190
Abbildung 71 Verteilung des <i>Enrichment Score</i> der Stoffwechselwege der putativen Zielgene von Hsa-mir-1.	191
Abbildung 72 Verteilung des <i>Enrichment Score</i> der Stoffwechselwege der putativen Zielgene von Hsa-mir-34a.	191
Abbildung 73 Verteilung des <i>Enrichment Score</i> der Stoffwechselwege der putativen Zielgene von Hsa-mir-34b.	192

Abbildung 74 Verteilung des <i>Enrichment Score</i> der Stoffwechselwege der putativen Zielgene von Hsa-mir-34c.....	192
Abbildung 75 Verteilung des <i>Enrichment Score</i> der Stoffwechselwege der putativen Zielgene von Hsa-mir-124.....	193
Abbildung 76 Verteilung des <i>Enrichment Score</i> der Stoffwechselwege der putativen Zielgene von Hsa-mir-148a.....	193
Abbildung 77 Verteilung der zehn häufigsten biologischen Prozesse der putativen Zielgene von Hsa-mir-596.....	194
Abbildung 78 Verteilung des <i>Enrichment Score</i> der Stoffwechselwege der putativen Zielgene von Hsa-mir-663.....	194

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Untersuchtes Patientenmaterial.....	38
Tabelle 2	Untersuchte Zelllinien.....	39
Tabelle 3	Verwendete Oligonukleotide.....	44
Tabelle 4	Digestion Solution.....	49
Tabelle 5	Reaktionsansatz Gesamt-cDNA-Synthese.....	50
Tabelle 6	Reaktionsansatz Gesamt-cDNA Synthese II.....	51
Tabelle 7	Reaktionsansatz Gesamt-cDNA Synthese III.....	51
Tabelle 8	Gesamt-cDNA Synthese-Programm.....	51
Tabelle 9	Reaktionsansatz für Gradienten-PCR (kDNA).....	52
Tabelle 10	PCR-Programm der Gradienten-PCR.....	53
Tabelle 11	Reaktionsansatz für iPCR (kDNA).....	54
Tabelle 12	PCR-Programm der iPCR.....	54
Tabelle 13	Standard-Primermix für iPCR's (Pyrosequenzierung).....	55
Tabelle 14	Reaktionsansatz für MSP (kDNA).....	56
Tabelle 15	PCR-Programm der MSP.....	56
Tabelle 16	Reaktionsansatz für M13-PCR (kDNA).....	57
Tabelle 17	PCR-Programm der M13-PCR.....	57
Tabelle 18	Reaktionsansatz der COBRA.....	59
Tabelle 19	Temperaturoptima und Reaktionspuffer der Restriktionsenzyme für COBRA.....	60
Tabelle 20	Ansatz von Mastermix und PCR-Produkt für Pyrosequenzierung.....	60
Tabelle 21	Ansatz Sequenzierprimer für Pyrosequenzierung.....	61
Tabelle 22	Standard-PAA-Gelansatz (6%).....	63
Tabelle 23	Standard-Agarose-Gelansatz (1%).....	63
Tabelle 24	Standard-Ansatz 1x TBE-Puffer.....	64
Tabelle 25	Standard-Ansatz 20x Borat-Puffer.....	64
Tabelle 26	Standard-Ansatz 1,5x RNA-Probenpuffer.....	65
Tabelle 27	Standard-Ansatz 0,8% Agarose-Gel.....	65
Tabelle 28	Reaktionsansatz für qRT-PCR (ACTB-Test).....	67
Tabelle 29	PCR-Programm der qRT-PCR.....	68
Tabelle 30	Reaktionsansatz für die qRT-MSP mit SYBR Green.....	69
Tabelle 31	PCR-Programm der qRT-MSP.....	69
Tabelle 32	Methylierungswerte der jeweiligen Mischverhältnisse von U- und M-DNA.....	70
Tabelle 33	Reaktionsansatz der TaqMan®-microRNA-cDNA-Synthese.....	71
Tabelle 34	Programm TaqMan®-microRNA-cDNA-Synthese.....	71
Tabelle 35	Reaktionsansatz der TaqMan® microRNA qRT-PCR.....	72
Tabelle 36	PCR-Programm der TaqMan®-microRNA-qRT-PCR.....	72
Tabelle 37	Reaktionsansatz für Nested-PCR (cDNA).....	73
Tabelle 38	PCR-Programm der Nested-PCR.....	73

Tabelle 39 Reaktionsansatz cDNA-Synthese 5'-RACE.....	75
Tabelle 40 Reaktionsansatz cDNA-Aufreinigung mit LPA für 5'-RACE.	75
Tabelle 41 dC-Markierung der aufgereinigten cDNA für 5'-RACE.....	76
Tabelle 42 Reaktionsansatz GSP2-PCR für 5'-RACE.....	76
Tabelle 43 PCR-Programm der GSP2-PCR.	77
Tabelle 44 Reaktionsansatz GSP3-PCR für 5'-RACE.....	77
Tabelle 45 Ansatz LB-Medium.....	79
Tabelle 46 Reaktionsansatz Hitzeschocktransformation.....	79
Tabelle 47 Reaktionsansatz Sequenziervorbereitung.	81
Tabelle 48 Eigenschaften der microRNA-Zielgen-Vorhersageprogramme TargetsCan.org, DIANA microT, miranda, TargetsCanS und PicTar.....	88
Tabelle 49 Publierte Methylierungsanalysen.	94
Tabelle 50 Chromosomale Lokalisation der microRNA-Kandidaten.....	95
Tabelle 51 Neudesign der PCR-Primer anhand Reevaluation der putativen Promotoren.	95
Tabelle 52 MicroRNA-Kandidaten nach Analyse in Zelllinien.....	98
Tabelle 53 Signifikanzen der differentiellen Methylierung der microRNA- Kandidaten.....	122
Tabelle 54 Signifikanzen der differentiellen Methylierung der microRNA- Kandidaten.....	123
Tabelle 55 Ermittlung der besten microRNA-Kandidaten.....	124
Tabelle 56 Ätiologische Daten und Ermittlung von CIMPs in 31 HCC-Fällen.	126
Tabelle 57 Zelllinien der Expressionsanalyse von Hsa-mir-1.....	132
Tabelle 58 Zusammenfassung der Testreihe microRNA-Zielgenvorhersage nach CA.....	146
Tabelle 59 Putative Zielgene der microRNA-Kandidaten mit Score ≥ 10	147
Tabelle 60 Putative Zielgene der microRNA-Kandidaten mit Score ≥ 10	148
Tabelle 61 Auszug aus der genomischen und regulatorischen microRNA- Datenbank.	150
Tabelle 62 Publierte Promotoren und regulatorische Elemente der microRNA- Kandidaten.....	153

Abkürzungsverzeichnis

ACTB	β-Actin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	eng.: <i>base pairs</i>
CA	Cord Albat
cDNA	engl.: <i>complementary DNA</i>
CDT	eng.: <i>capillary dispensing tips</i>
COBRA	eng.: <i>Combined Bisulfite Restriction Analysis</i>
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
C _T	eng.: <i>cycle threshold</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	eng. <i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	eng.: <i>expressed sequence tag</i>
FFPE-Gewebe	Formalin-fixiertes in Paraffin eingebettetes Gewebe
FLC	eng.: <i>fibrolamellar carcinoma</i>
FNH	eng.: <i>focal nodular hyperplasia</i>
gDNA	genomische DNA
HBV	Hepatitis B Virus
HC	eng.: <i>hemochromatosis</i>
HCC	eng.: <i>hepatocellular carcinoma</i>
HCV	Hepatitis C Virus
HPLC	eng.: <i>high performance liquid chromatography</i>

GenTG	Gesetz zur Regelung der Gentechnik
GO	eng.: <i>gene ontology</i>
kDNA	konvertierte DNA
LNG	Lebernorgewebe
LPA	lineares Polyacrylamid
M	Molarität
MALDI-TOF	eng.: <i>matrix assisted laser desorption/ionization - time of flight</i>
MS	Massenspektrometrie
MSP	Methylierungsspezifische PCR
N	<i>Normalität</i> ; Äquivalentkonzentration
NASH	eng.: <i>non-alcoholic steatohepatitis</i>
NG	Normalgewebe
NC	eng.: <i>negative control</i>
NTC	eng.: <i>no template control</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	eng.: <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	engl.: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PC	eng.: <i>positive control</i>
PPi	Pyrophosphat
PSQ	eng.: <i>pyrosequencing</i>
qRT-PCR	eng. <i>quantitative Real-Time PCR</i>
R	Purinbase (A/G)
RACE	eng.: <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
RNA	eng.: <i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SEM	eng.: <i>standard error of the mean</i>
SOB	eng.: <i>Super Optimal Broth</i>
SOC	SOB mit 20mM Glucose

SYBR Green I	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)- propylamino]-1-phenyl- 1 <i>H</i> -chinolin-4-ylidenmethyl}- 3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation
TBE	TRIS-Borsäure-EDTA
TE	TRIS-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	eng.: <i>transcription start site</i>
Y	Pyrimidinbase (C/T)

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Funktionen der Leber

Die Leber ist die größte Drüse des Körpers, die bei einem Erwachsenen durchschnittlich 1500g wiegt. Sie besteht aus mehreren Lappen und übt zahlreiche metabolische und sekretorische Funktionen aus. Die Leber sezerniert Gallensaft, eine Verdauungsflüssigkeit und metabolisiert Proteine, Kohlenhydrate und Fette. Sie dient als Speicherort für Glycogen und Vitamine und synthetisiert Gerinnungsfaktoren. Außerdem werden Giftstoffe und Abbauprodukte des Stoffwechsels sowie alte Erythrozyten in der Leber abgebaut und das Blutvolumen des Körpers reguliert.

Die Leber besteht hauptsächlich aus parenchymatischem Gewebe, das von Gallengängen und Blutgefäßen durchzogen ist (Welsch, 2006).

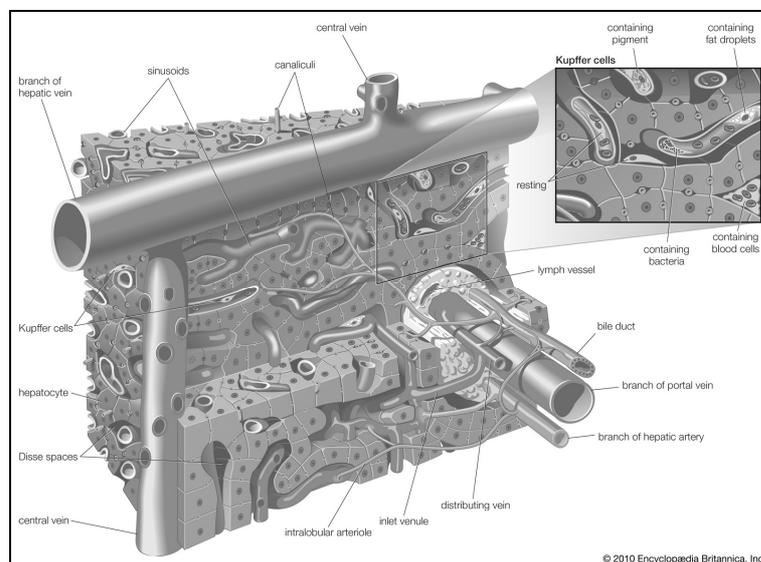


Abbildung 1 Mikroskopische Struktur der menschlichen Leber. (Encyclopædia Britannica, Inc., 2010, <http://www.britannica.com/>).

Das Lebergewebe besteht zu etwa 60% aus Hepatozyten (Parenchymzellen), außerdem Endothelzellen, von Kupffer-Sternzellen (Makrophagen der Leber), Cholangiozyten und einigen lymphoiden Zellen (Abbildung 1). Der klassische Aufbau der Leber besteht aus etwa 1-1,5 Millionen Zentralvenenläppchen, einer sechseckigen Struktur,

in deren Mitte die *Vena centralis* verläuft. An jeder zweiten Ecke befindet sich ein Periportalfeld bestehend aus einer Arterie, einer Vene, einem Lymphgefäß und einem Gallengang (Welsch, 2006).

1.2 Krebserkrankungen des Menschen

Pro Jahr erkranken weltweit über elf Millionen Menschen an malignen Neoplasien (*griechisch*: Neubildungen) und sieben Millionen Menschen sterben jedes Jahr an den Folgen dieser Krankheit. Diese bösartigen Tumore bestehen aus nicht oder nur gering differenzierten Zellen, die die Fähigkeit zur Metastasierung besitzen und in benachbartes Gewebe eindringen können. 11% aller Erkrankten in Europa sind Krebspatienten und 20% aller Todesfälle waren 2002 auf Krebs zurückzuführen (*World Health Organization*, 2002, <http://www.who.int/>).

1.3 Das hepatozelluläre Karzinom (HCC)

Das HCC (hepatozelluläres Karzinom) ist nach Lungenkrebs, Magenkrebs und Darmkrebs die vierthäufigste krebsassoziierte Todesursache und ist weltweit für jährlich 610.000 Tode verantwortlich (*World Health Organization*, 2004, <http://www.who.int/>). In Europa ist diese Zahl mit etwa 50.000 deutlich geringer als in Asien und Afrika, wo die meisten HCC-assoziierten Todesfälle pro Jahr auftreten.

Die wichtigsten mit dem HCC assoziierten Faktoren sind chronische Hepatitis B und C Infektionen, chronischer Alkoholkonsum, Aflatoxin B1 verseuchte Nahrungsmittel und nahezu alle zirrroseinduzierenden Faktoren. Man bezeichnet eine Leber als zirrrotisch, wenn diese einem vollständigen fibrotischen Umbau unterzogen wurde (Badvie, 2000).

Da weltweit etwa zwei Milliarden Menschen mit dem Hepatitis B-Virus infiziert sind und 30-50% der Hepatitis B-assoziierten Todesfälle auf das HCC zurückzuführen sind, ist die Erforschung der Ursachen dieser Krankheit ein global relevanter Teil der Krebsforschung (Lavanchy, 2004). An zweiter Stelle der viralen Erkrankungen steht die Hepatitis-C-Virusinfektion mit weltweit etwa 170 Millionen Infizierten, von denen etwa 2,5% ein HCC entwickeln. Insgesamt sind etwa 480 Millionen Menschen chronisch mit Hepa-

titis B und Hepatitis C infiziert. Beide Viruserkrankungen können wiederholte Abläufe der Nekrose, Entzündung und Regeneration, die gezielte Aktivierung von onkogenen Stoffwechselwegen sowie oxidativen Stress auslösen, die die Krebsentstehung begünstigen können (Farazi and DePinho, 2006).

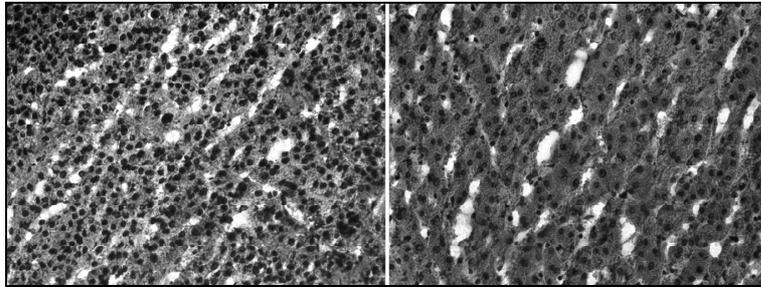


Abbildung 2 HCC31 Tumor (links) mit angrenzendem, nekrotischen Lebergewebe (rechts). HE-Färbung, 200x Vergrößerung, CA, 2009.

Die ethyltoxische Hepatokarzinogenese aufgrund chronischen Alkoholkonsums ist ebenfalls ein wichtiger Risikofaktor. Hierbei werden zunächst Entzündungsprozesse gefolgt von Phasen der Nekrose und Regeneration, ähnlich wie bei der HBV Infektion ausgelöst (McClain et al., 2002).

Der fibrotische Umbau der Leber bis hin zur vollständigen Zirrhose ist häufig die direkte Folge einer Hepatitis vor verschiedenen ätiologischen Hintergründen. Problematisch ist bei einer Leberzirrhose vor allem der Funktionsverlust, da parenchymatisches Gewebe in Bindegewebe umgebaut wird, das somit die Hauptfunktionen der Leber nicht mehr ausüben kann (Badvie, 2000).

Die Krebsentstehung in der Leber aufgrund einer Aflatoxin B1-Intoxifikation wird meist durch Mutationen aufgrund der karzinogenen Wirkung dieses Pilzgiftes ausgelöst (Feitelson et al., 2002).

Als genetische Auslöser der Hepatokarzinogenese wurden vor allem β -catenin-Mutationen und die Überexpression von *ErbB* und des *MET*-Rezeptors benannt (Farazi and DePinho, 2006). Außerdem können Mutationen des Tumorsuppressor-Gens *p53* eine Rolle spielen, da es unter anderem die microRNA-Familie Hsa-mir-34 direkt reguliert.

Die epigenetische Inaktivierung eines Gens, in diesem Falle *Rb*, im HCC wurde erstmals 1996 von Hada et al. (Hada et al., 1996) beschrieben. Im Jahr 2003 demonstrieren Saito et al. (Saito et al., 2003), dass die erhöhte Proteinexpression von DNMT1 (DNA-Methyltransferase 1) eine entscheidende Rolle im malignen Progress des HCC spielen könnte, da die erhöhte Aktivität dieses DNA-methylierenden Enzyms als Indika-

tor für eine schlechte Prognose und für auftretende Rezidive der Patienten verwendet werden kann. Im Jahr 2006 beschrieben Saito et al. die epigenetische Aktivierung der microRNA Hsa-mir-127 in Zelllinien mehrerer Krebsarten durch demethylierende Agenzien (Saito et al., 2006).

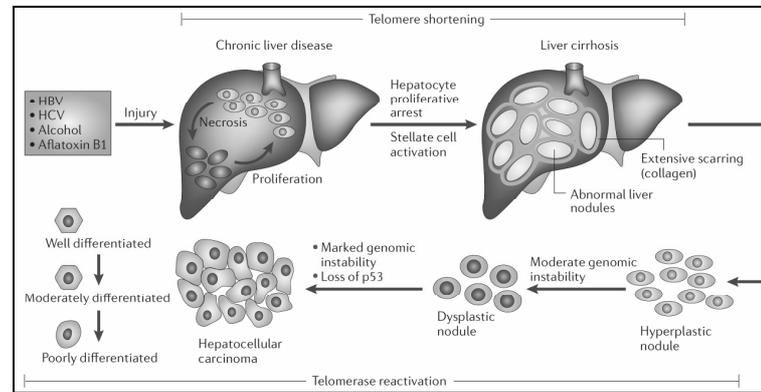


Abbildung 3 Schema der Hepatokarzinogenese. (Farazi and DePinho, 2006).

Calvisi et al. beschrieben die Aktivierung des Onkogens Ras und der Ras Effektoren ERK, AKT und RAL aufgrund epigenetischer Inaktivierung der Ras-Inhibitoren im HCC. Weiterhin demonstrierten sie, dass die Inaktivierung von SPRY1, SPRY2, DAB2 sowie SOCS4 und SOCS5 wie auch die Angiogenese-Inhibitoren BNIP3, BNIP3L, IGFBP3 und EGLN2 mit einer schlechten Prognose der Patienten assoziiert war. Interessanterweise wurden einige dieser Gene auch im angrenzenden nicht-neoplastischen Gewebe epigenetisch inaktiviert (Calvisi et al., 2007).

Im HCC werden bestimmte Tumorsuppressor-Gene wie *GSTπ1*, *RASSF1A* und *E-Cadherin* aberrant hypermethyliert (Huang, 2009), was zu deren Inaktivierung führen und somit die Karzinogenese begünstigen kann. Diese epigenetischen Defekte treten auch schon in präneoplastischen Vorstufen des HCC auf (Lehmann et al., 2007).

Weiterhin ist die genomische Instabilität ein häufig auftretendes Merkmal des hepatozellulären Karzinoms. Die Fälle von HBV-induzierten hepatozellulären Karzinomen wiesen ein erhöhtes Maß an genetischer Instabilität als Fälle ohne HBV-Infektionen auf (Bruix et al., 2004). Hierzu tragen unter anderem der Abbau von Telomeren, Fehler bei der Auftrennung der homologen Chromosomen und Veränderungen im DNA-Reparaturmechanismus bei (Farazi and DePinho, 2006).

Durch Genexpressionsanalysen war eine erste molekulare Klassifikation des HCC aufgrund von Prognose- und Ätiologiedaten möglich, die derzeit von anderen Forschergruppen ergänzt wird (Ladeiro et al., 2008). Die Arbeitsgruppe um Liu et al. hat gezeigt, dass Männer ein größeres HCC-Risiko als Frauen aufgrund der geringeren Konzentra-

tion des Hormons Östrogen haben können, welches einen putativen Schutzeffekt vor der Hepatokarzinogenese ausübt (Liu et al., 2009b).

1.3.1 Klinik und Behandlung des HCC

Die Diagnose des HCC erfolgt hauptsächlich über undefinierte Schmerzen im Bauchbereich, Gewichtsverlust und eine unregelmäßige und knotige Masse im Bauch. Andere Symptome, wie Feststellung des Ikterus, einer Gelbfärbung der Haut und der Bindehaut der Augen, die durch Fehlfunktionen der Leber ausgelöst werden, treten erst in fortgeschrittenen Stadien auf. Daher wird ein hepatozelluläres Karzinom meist erst relativ spät oder per Zufall bei einer Abdominalsonographie entdeckt (Kumar, 2004). Die Differenzierungs- und Schweregrade des hepatozellulären Karzinoms werden nach der TNM-Klassifikation nach Prof. Pierre Denoix aus den Jahren 1943-1952 in drei Codegruppen eingeteilt. Es wird zunächst die Ausdehnung des Tumors (T1-4), zweitens die Zahl und Lage der befallenen Lymphknoten (N0-2) und drittens das Vorhandensein oder Fehlen von entfernten Metastasen (M0 und M1) definiert (Harmer et al., 1970).

Anhand dieser Gradeinteilung werden unterschiedliche Therapiemöglichkeiten angewendet. Bei frühen Stadien ist eine Resektion im gesunden Lebergewebe möglich, in mittleren Stadien wird meist eine allogene Lebertransplantation oder eine perkutane Ethanolinjektion oder Radiowellenbestrahlung zur Abtötung des Tumors durchgeführt. Bei späten Stadien, bei denen sich der Tumor weit ausgedehnt hat, oder metastasiert ist, wird meist eine Chemotherapie angewendet. Im terminalen Stadium kann nur noch eine palliativmedizinische Behandlung der Symptome vorgenommen werden (Bruix et al., 2004).

1.4 Epigenetik - stabil vererbte Veränderungen der Genexpression

Die Epigenetik befasst sich mit stabil vererbten Modifikationen der Genexpression ohne Veränderungen der Primärsequenz. Hierzu zählen z.B. das Imprinting von Allelen, so dass entweder das maternale oder paternale Allel exprimiert wird (Reik and Walter, 2001), die Inaktivierung des X-Chromosoms und der bereits 1930 in *D. melanogaster*

entdeckte Positionseffekt. Hierbei werden euchromatische Gen-Regionen nach Verlagerung in einen neuen Genlocus in Nachbarschaft zu konstitutiven Heterochromatin, variabel heterochromatisiert, das heißt stillgelegt (Muller and Altenburg, 1930).

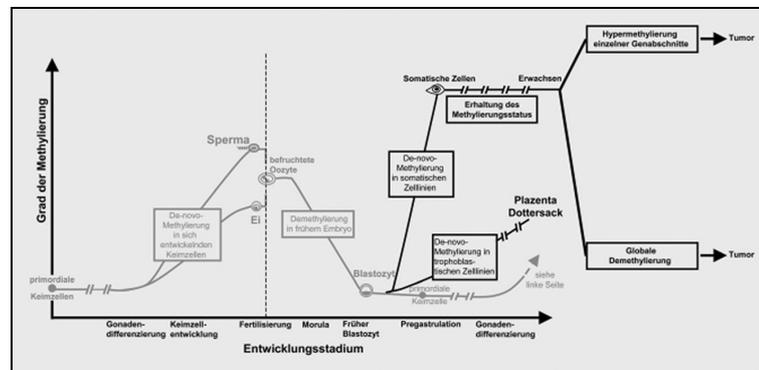


Abbildung 4 Methylierung des menschlichen Genoms. (Tannapfel, 2006).

Die am häufigsten untersuchten epigenetischen Modifikationen sind die DNA-Methylierung und Histonmodifikationen. Die Methylierung und Acetylierung bestimmter N-terminaler Regionen von Histonen ermöglicht die Genexpression, während die Demethylierung und Deacetylierung dieser Regionen, ähnlich wie die Methylierung von CpG-Dinukleotiden, die Genexpression hemmen kann (Guil and Esteller, 2009).

Die Methylierung bestimmter genomischer Regionen läuft wahrscheinlich bei adulten Zellen und embryonalen Stammzellen nach unterschiedlichen Mechanismen ab. In embryonalen Stammzellen (ESC) findet vermutlich etwa $\frac{1}{4}$ aller Methylierungsprozesse außerhalb eines CpG-Dinukleotid Kontexts ab. Diese nicht-CpG-assoziierte Methylierung soll daraufhin während der Differenzierung der ESC's verschwinden (Lister et al., 2009).

Die Methylierung des menschlichen Genoms trägt auch in wichtigem Maße zur genomischen Stabilität bei, das heißt eine globale Hypomethylierung, wie sie im HCC vorliegt, kann auch zu chromosomaler Instabilität führen (Chen et al., 1998). Diese chromosomale Instabilität kann wiederum die Karzinogenese begünstigen (Gaudet et al., 2003).

CpG-Inseln sind Regionen im Genom, in denen das CpG-Dinukleotid häufiger als erwartet auftritt. Die allgemein am besten anerkannten Kriterien zur Definition von CpG-Inseln von Takai und Jones schließen *Alu repeats* aus, die als falsch positive CpG-Inseln erkannt werden (Takai and Jones, 2002).

60% aller Gene des Menschen besitzen einen CpG-Insel assoziierten Promotor (Sharma et al., 2010). Die Gruppe um Baylin et al. beschrieb 1986 erstmals aberrante Methylierungen von CpG-Inseln im Krebs (Baylin et al., 1986).

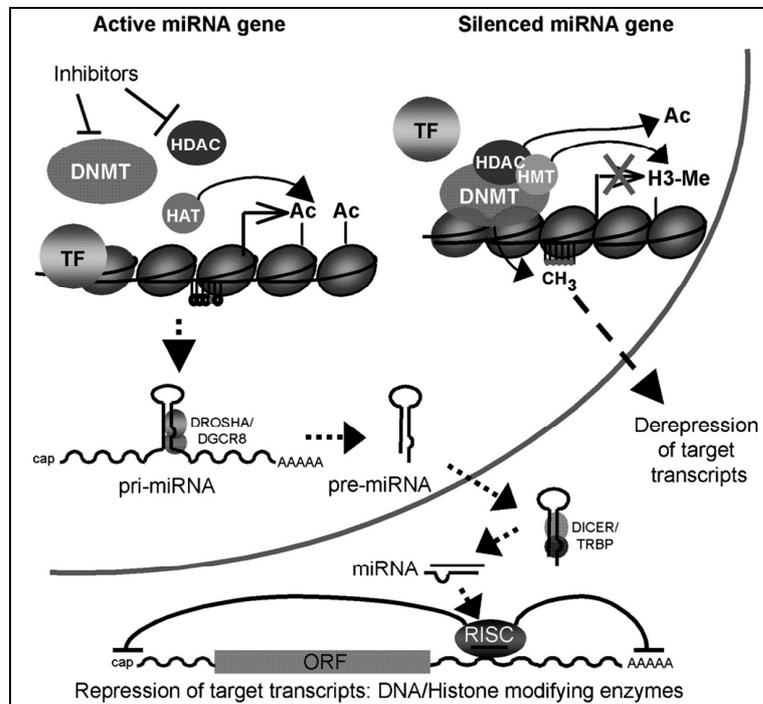


Abbildung 5 Epigenetische Regulation von microRNA-Genen. Dargestellt sind die Auswirkungen auf den microRNA-Pathway durch DNA-Methylierung und Histonmodifikationen (Guil and Esteller, 2009).

Die epigenetische Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen kann durch die Hypermethylierung der CpG-Inseln dieser Gene erfolgen (Harris, 1991). Die Hypermethylierung von CpG-Inseln kann das Anlagern von Transkriptionsfaktoren und die Transkription der nachgeschalteten Gene verhindern. Es konnte jedoch in einer neuen Publikation von Gebhard et al. gezeigt werden, dass die Bindung von Transkriptionsfaktoren an unmethylierte, CpG-reiche Promotorregionen in nicht-neoplastischen Zellen die Widerstandsfähigkeit dieser Zellen gegen aberrante Methylierungen im Krebs erhöht, indem diese Regionen sterisch gegen Methylierung geschützt werden (Gebhard et al., 2010).

Im HCC, wie auch in anderen Krebsarten, geht eine globale Hypomethylierung mit der Hypermethylierung bestimmter Tumorsuppressorgene einher (Calvisi et al., 2007) und (Park et al., 2007). Gleichzeitig sind diese beiden Prozesse auch Auswirkungen eines Alterseffekts, der die *de novo* Krebsentstehung begünstigt (Fraga et al., 2007).

1.5 Fibrolamelläre Karzinome, Leberadenome, fokal noduläre Hyperplasien und Siderosen

Das fibrolamelläre Karzinom (FLC), eine Variante des HCC, entsteht vorwiegend bei jungen Patienten von 20-40 Jahren, die im Vorfeld keine chronische Lebererkrankung, wie Zirrhose oder Hepatitis, hatten (Liu et al., 2009a). Die fokal noduläre Hyperplasie (FNH) ist eine polyklonale Hyperplasie der Leberzellen, die überwiegend bei Frauen durch Fehlbildungen von Blutgefäßen als Reaktion auf einen erhöhten Blutfluss auftritt. Diese beiden Erkrankungen werden in dieser Arbeit vergleichend betrachtet, um Rückschlüsse auf ähnliche Aberrationen im HCC zu ziehen. Das Leberadenom tritt ebenfalls häufiger bei Frauen, als Folge von chronischer hormoneller Kontrazeption oder sonstiger Nutzung von Sexualhormonen, auf. Es ist jedoch monoklonal und ein Teil der Leberadenome, die β -Catenin-aktivierten Adenome, können auch unter Umständen zu einem HCC transformieren (Boozari and Kubicka, 2010).

Bei der erblichen Hämochromatose, einer Siderose oder auch Eisenspeicherkrankheit, werden Eisensalze in erhöhtem Maße aufgenommen und in verschiedene Organe, wie Leber, Herz, Pankreas und Haut eingelagert. Die häufigste Form der Hämochromatose wird durch eine Mutation des *HFE*-Gens (*hemochromatosis, high Fe*), bei der dessen Funktion verloren geht, ausgelöst. Die Symptome werden meist im Alter von 40-60 Jahren sichtbar. Die kindliche Hämochromatose kann schon bei Säuglingen unter einem Jahr auftreten. Hierbei spielt das Protein *HJV* (*hemojuvelin*) eine wichtige Rolle, das in zwei chemisch veränderten Formen mit unterschiedlichen Löslichkeiten vorkommen kann, die die Eiseneinlagerung in bestimmte Organe beeinflussen können (Yan and Hart, 2009).

1.6 microRNAs - eine neue Gruppe kleiner, regulatorischer RNAs

Die 1993 am Beispiel von lin-14 in *C. elegans* entdeckten microRNAs sind kleine, 16-22nt lange Moleküle, die eine wichtige Rolle bei der posttranskriptionellen Regulation eukaryontischer Gene spielen (Lee et al., 1993), (Ambros, 2001). Sie werden aus einer 70-100nt langen Precursorform, die eine Haarnadelstruktur bildet, in deren einem Arm sich die mature Sequenz befindet, durch das Enzym DICER herausgeschnitten. Zum

heutigen Zeitpunkt (Stand: März 2010) sind 721 microRNA-Gene bekannt und etwa 800 weitere werden noch vermutet (<http://www.mirbase.org/>).

Die mature microRNA und die Precursorform sind in der Regel phylogenetisch konserviert. Wenn die Funktion von *DICER* gestört ist, kann eine Akkumulation der Precursorform beobachtet werden (Li et al., 2009a).

MicroRNAs werden wie proteincodierende Gene von Pol II DNA-abhängigen RNA-Polymerasen transkribiert. Die Suche nach microRNA-Promotoren gestaltet sich als schwierig, da fast alle Primärtranskripte von microRNAs (Pri-microRNAs) unbekannt sind (Li et al., 2009a).

Diese Pri-microRNAs werden polyadenyliert, wie es auch bei mRNAs der Fall ist, um diese zu stabilisieren (Kato et al., *Genes & Development*, 2009, 23). Sie besitzen ebenso eine 7-Methylguanosin-5'-Kappenstruktur (Cai et al., 2004).

Etwa 50% aller microRNA-Gene liegen geclustert im Genom vor (Li et al., 2009a). Als Beispiel der in dieser Arbeit untersuchten microRNAs sind Hsa-mir-34b und Hsa-mir-34c zu erwähnen, die gemeinsam auf dem Exon 2 des *EST ENSESTG00000013662* liegen. Diese Coexpression ist ebenso kein Einzelfall, da etwa 50% aller microRNAs in Introns von proteincodierenden Genen eingebettet vorliegen (Rodriguez et al., 2004). Intronische microRNAs werden durch Splicing und Prozessierung der pre-mRNA durch eine RNase und einen komplementierenden Reparaturkomplex zu Pre-microRNAs umgewandelt (Ying and Lin, 2005). Aus diesen Pre-microRNAs wird schließlich mit Hilfe der RNase *DICER*, *TRBP1* und *Ago2* im so genannten RISC Komplex die mature microRNA aus der Precursorform herausgeschnitten. MicroRNAs regulieren die Translation ihrer Ziel-mRNAs durch direktes Schneiden der mRNA, indem sie durch perfektes oder fast perfektes *seed-pairing* an ihre Zielsequenz binden (He and Hannon, 2004). Imperfektes *seed-pairing* führt zur Inhibition der Translation, indem die microRNA an der mRNA gebunden bleibt. Die so genannte *seed region* umfasst das zweite bis achte Nukleotid der muren microRNA (Li et al., 2009a).

Es konnte auch gezeigt werden, dass microRNAs die Deadenylierung von mRNAs auslösen können, die zur beschleunigten Degradation führt (Wu et al., 2006). In Abbildung 6 ist eine Übersicht über den Entstehungs- und Regulationsweg von microRNAs dargestellt.

Andererseits können microRNAs, wie Hsa-let-7a, die Translation bestimmter Zielgene hochregulieren (in diesem Falle *TNF α*), was aber eher selten und nur unter bestimmten Bedingungen, wie bei der Arretierung des Zellzyklus, vorkommt (Vasudevan et al., 2007). Eine microRNA kann gleichzeitig mehrere Zielgene auf Proteinebene herunterregulieren (Selbach et al., 2008).

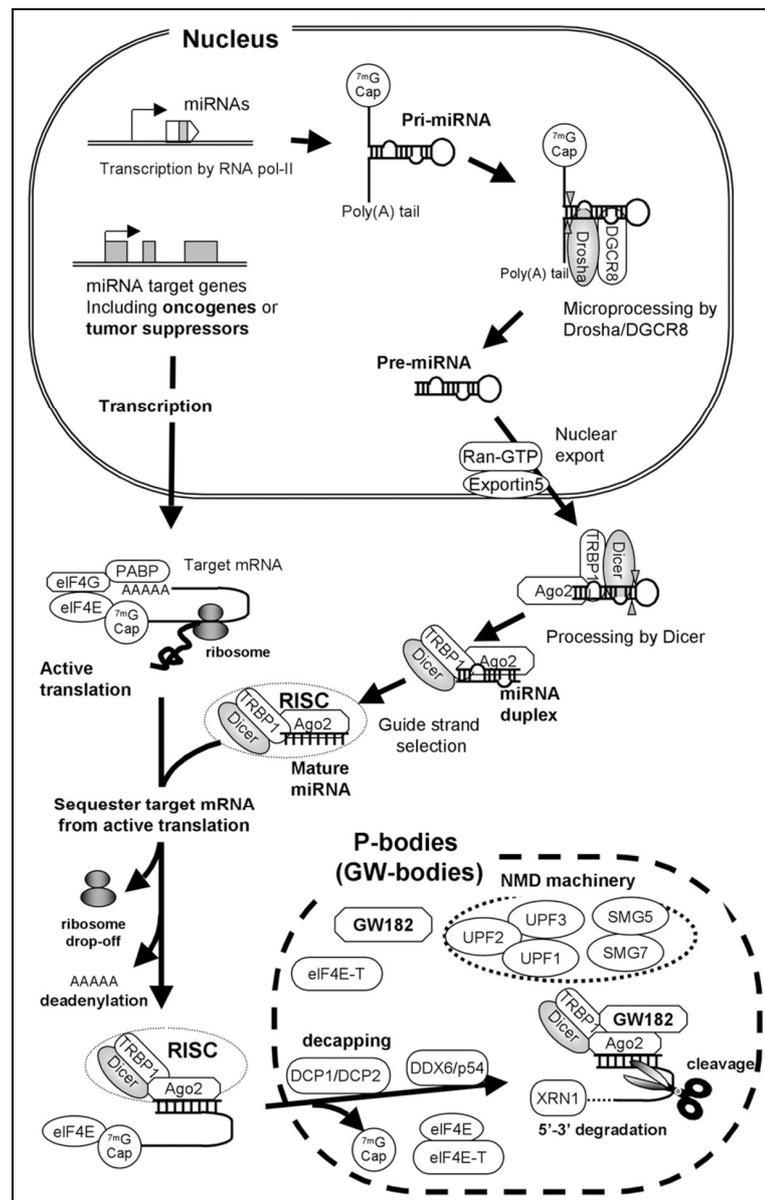


Abbildung 6 Schema des microRNA-Pathway. Die Transkription der microRNAs erfolgt im Nucleus, die Prozessierung im Cytoplasma und die Regulation der Zielgene in sog. P-Bodies (Osada and Takahashi, 2007).

Der erste Hinweis, dass microRNAs an der Krebsentstehung involviert sein können, war die Entdeckung, dass mir-15a und mir-16-1 bei den meisten Patienten mit CLL (chronic lymphatic leukemia) herunterreguliert oder deletiert sind (Calin et al., 2002).

Die differentiell regulierten microRNAs können sowohl als Onkogene als auch als Tumorsuppressor-Gene agieren (Zhang et al., 2007). MicroRNAs können sowohl in Tumoren als auch in angrenzendem Normalgewebe differentiell exprimiert werden (Calin and Croce, 2006). Außerdem wurde von der Gruppe um Lu et al. (Lu et al., 2005) eine generelle Herunterregulierung von microRNAs in Tumoren im Vergleich mit den jewei-

ligen Normalgeweben beobachtet. Zudem kann die Expression einiger microRNAs auch Einfluss auf die Prognose von Krebspatienten haben, indem z.B. wichtige Onkogene, wie Hsa-let7a-3, methyliert sind (Lu et al., 2007). Schließlich wurde festgestellt (Abbildung 5), dass microRNAs in Tumoren, angrenzendem Normalgewebe und gesundem Gewebe differentiell methyliert werden (Sleutels and Barlow, 2002). Anhand dieser Erkenntnisse wurden auch Korrelationen der Hypermethylierung der microRNA-Familien Hsa-mir-9 und Hsa-mir-34 sowie Hsa-mir-148a und des Metastasierungspotentials von Tumoren wie auch der individuellen Prognose entdeckt (Lujambio et al., 2008).

1.7 Untersuchtes Patientenmaterial

Die in dieser Arbeit untersuchten Materialien wurden auf zwei grundsätzlich verschiedene Weisen präpariert und gelagert. Ein Teil der Proben lag als kryoasserviertes Frischmaterial vor, das nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff bei -196°C eingefroren wurde. Die Lagerung der Biopsien erfolgte bei -80°C . Vorteilhaft ist, dass dieses Verfahren sehr schnell vonstatten geht und somit zur intraoperativen Diagnostik verwendet werden kann. Aus diesen Proben können qualitativ hochwertige, das heißt hochmolekulare Nukleinsäuren extrahiert werden, die in ihrer Qualität vergleichbar mit den Nukleinsäureextrakten aus humanen Zelllinien sind, da hierbei zelluläre Prozesse sofort gestoppt werden und ein Abbau der Nukleinsäuren ausbleibt. Nachteilig, speziell für histologische Untersuchungen, ist die schlecht erhaltene Morphologie (Leiva et al., 2003).

Der Großteil der untersuchten Proben lag jedoch als formalin-fixiertes, in Paraffin eingebettetes Material vor, das bei Raumtemperatur archiviert wurde. Der Fixierungsprozess, der einige Stunden bis Tage in Anspruch nehmen kann, bewirkt eine Quervernetzung von Nukleinsäuren und Proteinen durch das verwendete Formaldehyd, wodurch ein sehr guter Erhalt von zellulären Strukturen erreicht wird. Im Anschluss erfolgte eine Einbettung in Paraffin, das die Biopsien weiter stabilisiert. Wichtig ist hierbei, dass eine PBS-gepufferte Formaldehydlösung verwendet wird, da sonst über längere Zeiträume das Formaldehyd zu Methansäure oxidiert und die enthaltenden Nukleinsäuren vollständig degradiert werden können.

Dennoch besteht der Nachteil dieser Proben in der schlechteren Gesamtqualität der Nukleinsäuren, durch die starke Degradation von DNA und RNA, die in diesem Materi-

al in Fragmenten von durchschnittlich 300-400bp bei DNA sowie etwa 200bp bei RNA vorliegen (Lehmann and Kreipe, 2001).

1.8 Methylierungsanalyse von genomischer DNA

Um die in dieser Arbeit verwendeten Methylierungsuntersuchungen durchführen zu können, musste die genomische DNA durch die so genannte Bisulfitkonversion vorbehandelt werden (Abbildung 7), bei der methylierungsabhängige Sequenzunterschiede in die genomische DNA eingebracht werden (Frommer et al., 1992). Es können somit verschiedene Sequenzen entstehen: TG bei einer vollständig unmethylierten Sequenz, CG bei einer vollständig methylierten Sequenz und YG bei teilweise methylierten Sequenzen, wobei Y für C oder T steht.

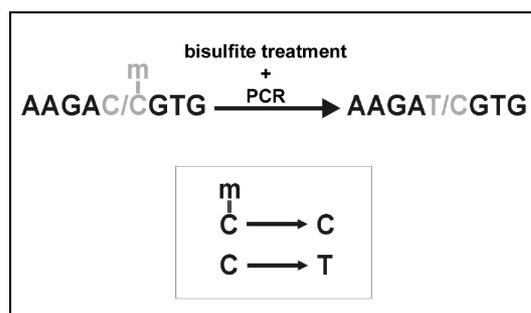


Abbildung 7 Schema der Bisulfitkonversion und Amplifikation durch PCR. (Lehmann, in press).

Obwohl die klassische Methode zur Untersuchung von DNA-Methylierungen, der Southern Blot, hierfür bereits 1981 etabliert wurde (Marcaud et al., 1981), ist die meistverbreitete Methode zur Methylierungsanalyse die Methylierungsspezifische PCR (MSP), die eine qualitative Aussage über den Methylierungszustand eines Gens ermöglicht, indem die Produktgrößen zweier Primerpaare für methylierte und unmethylierte Allele eines DNA-Abschnitts verglichen werden (Herman et al., 1996).

Diese Methode wurde später verbessert, indem in einer quantitativen Real Time-MSP die ΔC_T -Werte der methylierten und unmethylierten PCR-Produkte verglichen wurden, was eine semiquantitative Auswertung ermöglichte (Eads et al., 2000).

Schließlich wurde in der Zwischenzeit eine alternative, semiquantitative Methode, die *Combined Bisulfite Restriction Analysis* (COBRA) entwickelt, um anhand von methylierungssensitiven Restriktionsschnittstellen die Methylierung eines PCR-Produktes durch

die Quantifizierung der Restriktionsfragmente zu bestimmen (Xiong and Laird, 1997). All diese Methoden haben jedoch den Nachteil, dass keine quantitativen Daten ermittelt werden können.

1.8.1 Quantitative Methylierungsanalysen

Die Pyrosequenzierung (Ronaghi et al., 1998) ist eine neue, quantitative Methode zur DNA-Sequenzierung, bei der der Einbau eines einzelnen Nukleotides detektiert und quantifiziert werden kann (Abbildung 8).

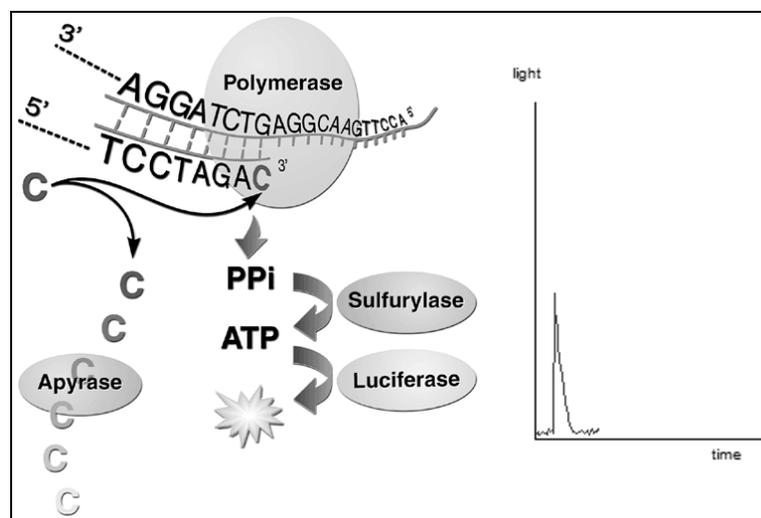


Abbildung 8 Schematische Darstellung der Pyrosequenzierung. Durch eine Enzymkaskade wird der Einbau eines Nukleotides in ein quantifizierbares Fluoreszenzsignal umgewandelt (Reproduktion mit freundlicher Genehmigung der Firma Biotage).

Diese Methode eignet sich neben der Mutationsanalyse von bestimmten Genabschnitten, auch zur Methylierungsanalyse. Hierbei wird bisulfitmodifizierte DNA verwendet, bei der eine potentiell polymorphe Position an jedem CpG-Dinukleotid durch die Natriumbisulfitbehandlung geschaffen wird (Abbildung 7).

Anhand der bei der Sequenzierung detektierten Signale ist eine Quantifizierung der allelischen Verhältnisse von polymorphen Positionen möglich (Ronaghi et al., 1998).

Nachdem die zu untersuchende genomische DNA mit Natriumbisulfit vorbehandelt und in einer methylierungsinsensitiven PCR amplifiziert wurde, kann in der Pyrosequenzierung die Methylierung jedes CpG-Dinukleotides des untersuchten Amplicons prozentual quantifiziert werden (Abbildung 9). Die Analyseergebnisse werden in einer Py-

rogramm genannten, grafischen Darstellung der Signalintensitäten und der Sequenz zusammengefasst.

Dieses Verfahren wurde erstmals 2002 von der Arbeitsgruppe um Peter Nürnberg etabliert (Uhlmann et al., 2002). Durch eine Verbesserung der Analysesoftware können nun Sequenzen von bis zu 150bp Länge untersucht werden. Dies stellt eine erhebliche Vergrößerung des analysierbaren Bereichs dar, da die Pyrosequenzierung initial nur zur Analyse von 10-20bp langen Sequenzen konzipiert wurde.

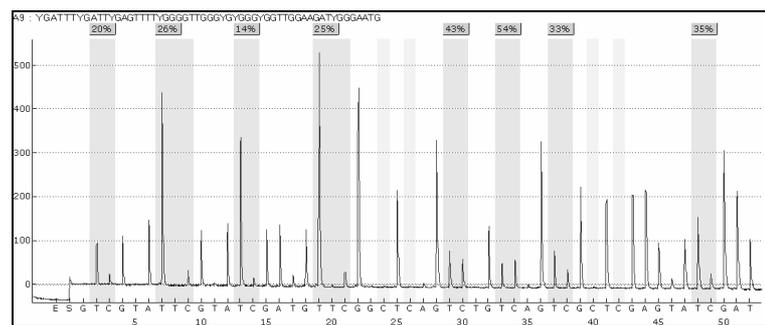


Abbildung 9 Beispiel eines Pyrogramms. Dargestellt ist die Methylierungsanalyse der miRNA Hsa-mir-148a in der Zelllinie Raji; X-Achse: Sequenz (bp); Y-Achse: Signalintensität; Prozentwerte in blauen Kästchen: Qualität der Sequenzierung (blau= einwandfrei) und Methylierungsgrad (Lehmann, in press).

Da mit dieser Methode eine exakte Quantifizierung des Methylierungsgrades jedes einzelnen untersuchten CpG-Dinukleotides durchgeführt werden kann, ist sie allen anderen DNA-Methylierungsanalysen, wie der MSP, COBRA, qRT-MSP und Bisulfitsequenzierung, klar überlegen. Dennoch birgt diese Methode einige Nachteile, wie die einerseits immer noch begrenzte Länge des sequenzierbaren Bereichs und andererseits Probleme bei der Amplifikation und Sequenzierung von extrem GC-reichen Sequenzen, die nicht durch Pyrosequenzierung untersucht werden können (Lehmann, in press).

Neben der Pyrosequenzierung wurden auch einige andere quantitative Methoden zur Methylierungsanalyse entwickelt, die auf unterschiedlichen Technologien, wie der MALDI-TOF basierten Massenspektrometrie oder der 454 Pyrosequenzierung basieren. Beide Technologien sind für den Einsatz als Hochdurchsatzverfahren geeignet.

Bei der MALDI-TOF-Methode wird genomische DNA nach einer Bisulfitbehandlung in einer PCR amplifiziert und vom (-)-Strang in vitro transkribiert. Nach diesem Prozess weisen unmethylierte CpG-Dinukleotide auf dem (-)-Strang die Sequenz ApC, methylierte CpG-Dinukleotide die Sequenz GpC auf. Schließlich wird das RNA-Produkt basenspezifisch an jeder U-Position geschnitten und die Restriktionsfragmente über eine

MALDI-TOF analysiert, wobei methylierte Sequenzen einen Massenzuwachs von 16 Da (G→A) zeigen. Die Bestimmung der molekularen Masse erfolgt hierbei durch die Flugzeitbestimmung des durch einen Laser ionisierten Probenfragmentes (Ehrich et al., 2005).

Mit der 454 Pyrosequenzierung können mit unterschiedlichen Methoden erstellte Bibliotheken aus bis zu 250bp langen, adapterflankierten Teilstücken methylierter genomischer DNA analysiert werden (Margulies et al., 2005). In einer so genannten emPCR (Emulsions-PCR) werden in einem *multi-template*-Verfahren in einer Wasser-Öl-Emulsion die zu untersuchenden DNA-Fragmente an 28µm große *beads* gebunden. Dies geschieht dadurch, dass einer der PCR-Primer bereits mit seinem 5'-Ende an diese *beads* gekoppelt ist und bei der Amplifikation die Verbindung zwischen DNA-Fragment und *bead*-gekoppeltem Primer geschaffen wird. Die Sequenzierung erfolgt ähnlich der normalen Pyrosequenzierung, mit der Besonderheit, dass ein universeller Sequenzierprimer verwendet wird, der an den Adapter eines der PCR-Produkte bindet (Shendure and Ji, 2008).

Alternativ zu den oben beschriebenen Methoden wurden noch weitere MALDI-TOF basierte Methoden, wie beispielsweise der GOOD-Assay (Tost et al., 2003) sowie Primer-Extensionsysteme wie SnapMeth (Uhlmann et al., 2002) entwickelt, die aber nicht so weit verbreitet sind, wie die Pyrosequenzierung.

1.9 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Untersuchung von Veränderungen im Methylierungsmuster von microRNA-Genen im hepatozellulären Karzinom (HCC) und dessen Vorstufen; insbesondere in Leberzirrhosen und Siderosen. Dabei werden die genspezifischen Methylierungsaberrationen auch im Kontext der generalisierten Hypomethylierung des menschlichen Genoms im Verlauf der HCC-Entstehung und Progression analysiert. Es sollen hierbei Methylierungsaberrationen der microRNA-Gene (Hyper- und Hypomethylierung) und deren Auswirkungen auf die Genexpression untersucht werden. Mögliche Subtypen und Ätiologie-spezifische DNA-Methylierungsmuster sollen ermittelt und eine potentielle Bedeutung für Diagnostik und Monitoring abgeklärt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit werden Zellkulturen von humanen HCC-Zelllinien, in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete humane Gewebeproben sowie kryoasservierte hu-

mane Biopsien auf aberrierende DNA-Methylierungen untersucht. Für alle humanen Gewebeproben wird die archivierte, histologische Diagnose noch einmal in einem vereinheitlichten, standardisierten Beurteilungsverfahren durch einen Pathologen verifiziert.

Um putative microRNA-Kandidaten für diese Analysen auszuwählen, werden zunächst alle humanen microRNA-Gene auf CpG-Insel-Assoziation hin untersucht. Dies geschieht mit einer Auswahl von frei verfügbaren, webbasierten Programmen zur *in silico* Vorhersage von CpG-Inseln.

Die in diesem Schritt ermittelten humanen CpG-Insel-assoziierten microRNAs werden dann in einer initialen Überprüfung mittels COBRA (*Combined Bisulfite Restriction Analysis*), einer semiquantitativen Methode zur Methylierungsanalyse, untersucht.

Für die detaillierte Überprüfung der aus der COBRA hervorgegangenen Kandidaten wird die quantitative Methylierungsanalytik mit Einzel-CpG-Auflösung mittels Pyrosequenzierung eingesetzt, da zum heutigen Zeitpunkt noch keine übergreifende, quantitative Analyse der aberranten Methylierung von microRNA-Genen in der Leber publiziert wurde.

Der Zusammenhang zwischen aberranter Methylierung und Expression wird nachfolgend mittels quantitativer Real Time-PCR untersucht. Alle diese Verfahren sind geeignet zur Analyse von konventionell für die Diagnostik fixierten Gewebeproben.

Sämtliche aus diesen Analysen hervorgehenden, differentiell methylierten Regionen in microRNA-Genen sollen im Folgenden *in silico* auf cis-regulatorische Elemente mit Hilfe von Programmen zur Vorhersage von putativen Promotoren intergenischer microRNAs untersucht werden, um gegebenenfalls Rückschlüsse auf krankheitsspezifische Regulationen dieser microRNAs ziehen zu können.

Des Weiteren soll in einer *in silico*-Analyse die Vorhersage von putativen Zielgenen der microRNA-Kandidaten evaluiert werden, wobei zunächst zur Ermittlung möglicher Zielgene mehrere microRNA-Zielgen-Vorhersage-Programme verwendet werden. In diesem Schritt wird auch die Optimierung der Nutzung dieser Programme zur Erhöhung der Vorhersageeffizienz angestrebt.

Außerdem wird bei der Untersuchung der Zielgene die biologische Funktion der microRNAs betrachtet, die in einer übergreifenden Analyse anhand bereits publizierter Daten durchgeführt werden soll.

2 Material

Es werden nachfolgend nur die über die Standardausrüstung eines molekularbiologischen Labors, wie beispielsweise Mikroliterpipetten, Reaktionsgefäße und Arbeitsbänke hinausgehenden Materialien aufgeführt.

2.1 Puffer, Kits und Chemikalien

5'-RACE-Kit	5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
10x PCR-Puffer	10x PCR Rxn Buffer (-MgCl ₂), 200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	APS für die Molekularbiologie, Applichem, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Ampicillin, Applichem, Darmstadt, Deutschland
Annealing-Puffer	PyroMark Annealing Buffer, Qiagen, Hilden, Deutschland
Aqua bidest.	Water, Baker analyzed, Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, USA
β-Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol for Synthesis, Merck, Darmstadt, Deutschland
Binding-Puffer	PyroMark Binding Buffer, Qiagen, Hilden, Deutschland
Borsäure	Borsäure ≥99,8%, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Trichlormethan/Chloroform ≥99%, zur Synthese Roth, Karlsruhe, Deutschland

DEPC-Wasser	0,2% (v/v) Diethyl-Pyrocbonat, Fluka, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, in vollentsalztem Wasser (2x autoklaviert)
Dextran	Dextran, 20% solution, (w/v) Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
DNA-Größenmarker	pBR322 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, improved Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland 1Kb DNA Ladder, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
DNase RQ1	DNase RQ1 für cDNA-Synthese, Promega, Mannheim, Deutschland
dNTPs	100 mM dNTP Set (Gebrauchslösung: 10mM je Nukleotid), Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
EDTA	EDTA Dinatriumsalz Dihydrat, Applichem, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Ethidiumbromidlösung, 1%, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Ethanol absolute, Baker analyzed, Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, USA
EZ DNA Methylation Kit	EZ DNA Methylation Kit, Zymo Research, Orange, CA, USA
Gelextraktionskit	QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland
Glykogen	Glycogen for mol. biol. (20 mg/ml), Roche, Basel, Schweiz
Hefeextrakt	Hefeextrakt BioChemica Applichem, Darmstadt, Deutschland
HPLC-Wasser	Water, Baker HPLC analyzed, Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, USA
Isopropanol	2-Propanol, Baker analyzed, Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, USA

Kältespray	Solidofix Kältespray, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ladepuffer	10x Loading Dye (Fermentas)
Lineares Polyacrylamid (LPA)	GenElute LPA, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
MgCl ₂	50mM MgCl ₂ , Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Na-Acetat	Natriumacetat, 99%, p.a., wasserfrei, Roth Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Natriumchlorid, Fluka, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
NaOH	Natriumhydroxid Plätzchen, Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS	Phosphate Buffered Saline 1x, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PCR-Wasser	Aqua ad iniectabilia, Braun, Melsungen, Deutschland
Phenol	Roti®-Aqua-Phenol, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, 25:24:1 Roth, Karlsruhe, Deutschland
Plasmid-Präp-Kit	QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland
Platinum Taq	Platinum Taq DNA Polymerase, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Polyacrylamidlösung	Rotiphorese® Gel 40 (19:1), Roth, Karlsruhe, Deutschland
Proteinase K	Proteinase K 30mAnson-U/mg, Merck, Darmstadt, Deutschland
Puffer RQ1	RQ1 10x Puffer für cDNA-Synthese, Promega, Mannheim, Deutschland

Pyro-Reagenzien	PyroMark Gold Q96 CDT Reagents, Qiagen, Hilden, Deutschland
Random-Hexamere	p(dN)6 Random Hexamer (500ng/ml), Amersham, GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
Restriktionsenzyme	Bsh1236I (BstUI) 2500 units (10u/μl) Tail (Maell*) 2000 units (10u/μl) TaqI 5x3000 units (10u/μl) Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
RNAse A	RNAse A, Applichem, Darmstadt, Deutschland
RNeasy Kit	RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland
ROX	ROX Reference Dye, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
SOC Medium	2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl ₂ , 1mM MgSO ₄ , 20mM Glucose
Stop Solution RQ1	RQ1 Stop Solution für cDNA-Synthese, Promega, Mannheim, Deutschland
Streptavidin Sepharose Beads	Streptavidin Sepharose High Performance, GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
SYBR Green	SYBR Green I (Invitrogen) 10.000x Stock Solution in DMSO (Gebrauchslösung: 1:100 in DMSO verdünnen, dann 1:100 in 1X TE)
TaqMan® MicroRNA Assays	20X TaqMan® MicroRNA Real-Time PCR Assay, Includes 5X stem-loop Reverse Transcription Primer and MuLV Reverse Transcriptase, Applied Biosystems, Foster City, USA
TBE-Puffer	1x TBE-Puffer 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2mM EDTA, pH=8,0
TEMED	TEMED Applichem, Darmstadt, Deutschland

TE-Puffer	1x TE-Puffer: 10mM Tris, 1mM EDTA, pH=8,0
TOPO TA Cloning Kit	TOPO TA Cloning Kit for Sequencing mit pCR4TOPO Vektor und TOP10 chemisch kompetenten <i>E.coli</i> Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Tris	Tris Ultra Qualität $\geq 99,9\%$, Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIzol®	TRIzol® Reagent, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trypton	Trypton aus Casein, Fluka, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat, Tween20 für die Molekularbiologie, AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Waschpuffer	PyroMark Wash Buffer 10x, Qiagen, Hilden, Deutschland
Xylolersatz	XEM-200, Vogel, Gießen, Deutschland

2.2 Geräte

96 Well PCR-Platte	MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 ml, Applied Biosystems, Foster City, USA
7500 Real-Time PCR System	7500 Fast Real-Time PCR System mit Software SDS 1.3, Applied Biosystems, Foster City, USA
Autoklav	Tuttnauer 5050ELV, Systec GmbH Systemtechnik, Wettenberg, Deutschland
Elektrophorese-Netzteil	PowerPac 300, BioRad, München, Deutschland

Geldokumentationssystem	Intas Gel Imaging System, Intas, Göttingen, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	Sigma Gelkammer #237,503-9, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Graphpad Prism	Prism 5.0, GraphPad Software, San Diego, USA
Kühlzentrifuge	Heraëus Fresco 17 Centrifuge, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kryostat	Leitz Wetzlar Kryostat 1720, Leitz, Wetzlar, Deutschland
Objektträger	SuperFrost Menzel-Gläser, Menzel, Braunschweig, Deutschland
Optischer Film für PCR-Platten	MicroAmp® 96- & 384-Well Optical Adhesive Film, Applied Biosystems, Foster City, USA
Parafilm	Parafilm M, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Photometer	Beckman DU® 640 Spectrophotometer
PSQ-Platte	PyroMark Q96 HS Plate, Qiagen, Hilden, Deutschland
Pyrosequenzierer	PyroMark Q96 MD, Qiagen, Hilden, Deutschland
Schüttelinkubator	Eppendorf Thermomixer Kompakt, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
T1 Thermocycler	Biometra T1 Thermocycler, Biometra GmbH Göttingen, Deutschland
TGradient Thermocycler	Biometra TPersonal Thermocycler, Biometra GmbH Göttingen, Deutschland
Tischzentrifuge	Heraëus Fresco 17 centrifuge, Heraëus, Hanau, Deutschland
TPersonal Thermocycler	Biometra TPersonal Thermocycler, Biometra GmbH Göttingen, Deutschland

Vakuumstation	PyroMark Q96 Vacuum Prep Workstation, Qiagen, Hilden, Deutschland
Wasserbad	Huber A6 mit Polystat cc2, Landgraf Laborgeräte, Langenhagen, Deutschland

2.3 Gewebe und Zelllinien

2.3.1 Patientenmaterial

Es wurden Proben von insgesamt 194 Patienten untersucht. Die Krankheitsbilder und Größen der Kohorten sind in Tabelle 1 verzeichnet.

Gewebe	Material	Anzahl	Proben
HCC und angrenzendes Normalgewebe	Kryomaterial	31	HCC1- HCC31
junge HCC (<40 Jahre) und angrenzendes Normalgewebe	FFPE-Material	8	HCC32- HCC39
HCC ohne Zirrhose und angrenzendes Normalgewebe	FFPE-Material	10	HCC40- HCC49
HCC-Primärtumore	FFPE-Material	10	HCC50-HCC59
FLC und angrenzendes Normalgewebe	FFPE-Material	17	FLC1- FLC17
Leberadenome und angrenzendes Normalgewebe	FFPE-Material	20	LA1-LA20
Siderose mit HCC	FFPE-Material	17	HCHCC1-HCHCC17
FNH	FFPE-Material	10	FNH1-FNH10
Zirrhose	FFPE-Material	18	CIR1-CIR18
Siderose ohne HCC mit HFE-Mutation	FFPE-Material	10	HCHFE1-HCHFE10
kindliche HC	FFPE-Material	10	HC1-HC10
gesunde Leber	FFPE-Material	20	LE1-LE20
gesunde Leber (alte Proben)	FFPE-Material	13	LE21-LE33

Tabelle 1 Untersuchtes Patientenmaterial. Untersuchte Kohorten, Probenmaterial und Abkürzungen der Proben.

2.3.2 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden insgesamt 14 Zelllinien sowie humane Lymphozyten, Granulozyten und Plazenta als gesunde Kontrolle untersucht. Die verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2 abgebildet.

Zelllinie	Ethnologie	Geschlecht	Alter (Jahre)	Krankheit	Referenz
CaKi-2	Kaukasier	♂	69	Nieren-Karzinom	(Fogh et al., 1977)
Cal-51	Kaukasier	♀	45	Mamma-Karzinom	(Gioanni et al., 1990)
HepG2	Kaukasier	♂	15	HCC	(Aden et al., 1979)
HLE	Asiate	♂	68	HCC	(Dor et al., 1975)
HLF	Asiate	♂	68	HCC	(Dor et al., 1975)
Huh-7	Asiate	♂	57	HCC+HCV	(Nakabayashi et al., 1982)
KG1a	Kaukasier	♂	59	AML	(Koeffler et al., 1980)
KPL-1	Asiate	♀	50	Mamma-Karzinom (Derivat von MCF-7)	(Kurebayashi et al., 1995)
MCF-7	Asiate	♀	50	Mamma-Karzinom	(Kurebayashi et al., 1995)
MDA-MB-231	Kaukasier	♀	51	Mamma-Karzinom	(Cailleau et al., 1974)
MDA-MB-361	Kaukasier	♀	40	Mamma-Karzinom	(Cailleau et al., 1974)
Raji	Afrikaner	♂	12	Burkitt's Lymphom	(Pulvertaft, 1964)
TE-671	Kaukasier	♀	6	Rhabdomyosarkom	(McAllister et al., 1977)
ZR-75-1	Kaukasier	♀	63	Mamma-Karzinom	(Engel et al., 1978)

Tabelle 2 Untersuchte Zelllinien. Herkunft, Art der Neoplasie und Referenz der Zelllinie.

2.4 Nukleinsäureextraktionen

2.4.1 DNA und RNA aus Patientenmaterial

Sowohl DNA als auch RNA wurden aus FFPE-Material und frisch eingefrorenem Kryomaterial gewonnen, wobei beide Nukleinsäuren aus den gleichen Schnitten stammen. Es wurden nur große Resektate verwendet, sodass auch nach erfolgter Abnahme von Schnitten für die Nukleinsäureextraktion ein Reststück ausreichender Größe zurückblieb.

2.4.2 DNA und RNA aus Zelllinien

Es wurden zeitgleich DNA und RNA aus den drei HCC-Zelllinien Huh-7, HLE und HLF extrahiert. In dieser Arbeit verwendete Nukleinsäuren anderer Zelllinien lagen bereits fertig vor.

2.4.3 Konversion von genomischer DNA zur Methylierungsanalyse

Ein Teil der extrahierten DNA wurde mit dem EZ DNA-Methylation Kit konvertiert und für die Methylierungsanalysen verwendet.

2.5 Oligonukleotide

Neu zu synthetisierende Oligonukleotide wurden bei den Firmen Sigma-Aldrich, München, Deutschland und Operon, Ebersberg, Deutschland bestellt (Tabelle 3).

2.5.1 Primer und Sonden

Die Stammlösungen der Konzentration 100pmol/μl wurden mit 1x TE-Puffer angesetzt. Die Gebrauchslösungen mit 5'- und 3'-Primer (10pmol/μl) wurden mit Aqua bidest. hergestellt.

Analyse/Primerpaar	5'-Primer	3'-Primer	MgCl ₂ (mM)	T _{Annealing} (°C)	Produkt (bp)
COBRA					
124a1-1i5'/1i3'	TTT TTT TAG GAG AAA GGT TTT	AAA ACT CCA AAC CCC TC	1,5	60	216
124a1-2i5'/2i3'	GAG YGA GAG GAT TGT AGT AGG	ACA ACA TCA ACC CCA CCT C	1,5	65	295
124a3-1i5'/2i3'	AAA GGG GAG AAG TGT GG	CAT ACC TTA ATT ATA TAA ACA TTA AAT C	2,5	55	251
126-1i5'/1i3'	ATA TTA GTT AAG AAG GTA GAA GTG TT	CTC AAA CCC AAA CCT CTA C	1,5	55	333
127-1i5'/1i3'	TTG GTA TTT ATA GGT TTT TAA GG	ACT CTC CCT ACT ACC TAA AAA AC	2,5	60	289

Analyse/Primerpaar	5'-Primer	3'-Primer	MgCl ₂ (mM)	T _{Annealing} (°C)	Produkt (bp)
133a2-1i5'/1i3'	TAT TAG TTT TTG TAG AGT TTG AGG G	AAA CTT CAC TTA CTT AAA ACT AAC CAC	1,5	60	354
148a-1i5'/1i3'	TGG GTA TTT GTT TTT GTT GAT TG	ACT ACA CTT AAA CCC CCT CTA ACC	1,5	60	370
148a-2i5'/1i3'	TTG TAG GAA GAA ATT TTT GGA GG	ACT ACA CTT AAA CCC CCT CTA ACC	1,5	65	243
149-1i5'/1i3'	GGA GGT TTT TTG TTT TTG ATT G	CAC CTA CAA ATT CTA AAA AAC TCC CT	1,5	60	368
152-1i5'/1i3'	GGA ATT TTG TGT TAT TTT TGA TTG	CCA AAC AAA TAT TCC ACT ACA AAC	1,5	60	459
153-1-1i5'/1i3'	TGG TGT YGG AGT ATA TTT GGT G	ACA ACC RAA ACC TCA AAC CTA C	1,5	60	335
191-1i5'/1i3'	TTG ATT TAA GTT AAG GGT TTA TTG G	CCA CRA AAC CTA AAC CAC TAA TAC	1,5	60	347
193a-1i5'/1i3'	GTA ATT TTT GGA GGG TTG G	TAA ACC AAA AAA CAA CCT AAC C	1,5	60	351
193b-1i5'/1i3'	TTG GTA TTT TGG TGA GAT GAA T	AAC AAA CCT CCC CCT CTT TC	1,5	60	358
193b-3i5'/3i3'	TAG TGT TTG GGT TTG GAA	CCA AAA CTA CCT ACT TCT C	1,5	60	298
196b-1i5'/1i3'	TAT TTT ATT GGG GTT TGT GGT	AAA TTA CCA CCA CAA ACC TAA	1,5	55	375
196b-2i5'/2i3'	GTA GGT TGT TTA GGG GTT GG	CCT AAC CCT ACC TAC TAT AAC CAA	1,5	55	408
200a-1i5'/1i3'	TTT GGG TTT TTA TAG TAG TTT TTG	AAA CTA ACA CAA ACC CTC TAC C	1,5	60	345
200b-1i5'/1i3'	GAT GTT GTT TTT AGT GTT TTA GGA G	CCC TAA ATA CAA CTA CAA AAA ACC	2,5	60	404
203-1i5'/1i3'	GTG GTT GTA GTA GGG TAG GG	CAA CCA AAC CCT AAA AAC TAC	1,5	64,4	386
203-2i5'/2i3'	GTT GAG TTA GGG TTA TTT T	CCT AAC RCT AAA AAA TCC	1,5	57	302
208a-1i5'/1i3'	TTG AGT TTT TTG TGT TTG ATT TAG GTA	CCT TCT CCA ACT TCT ACT TCA CCC	1,5	60	346
210-1i5'/1i3'	TAT TGG TTG AGG GAT TAG GTT	CCA CAA TAT CCA ACT ACC CTC	1,5	55,5	491
212-1i5'/1i3'	GGA GGY GGA GTA GTA GAG TTT T	CTA TTA CCT CCA ATT CCC ACA A	1,5	55	480
219-1-1i5'/1i3'	GGA GTT TTA TTT TGT GTA TGT TTT TG	TCC TAA AAA CAC ACC TAA ATC CC	1,5	60	296
219-2-3i5'/3i3'	GAG ATT TTA GGT TGG GGG	AAA CTC AAC CAC AAA TAT CCA	1,5	64	413
320-1i5'/1i3'	GGA TTA TTT AGG TGA GAG TTT TTG G	CCA AAC CAA TCA CCT CAT CC	1,5	60	348
339-1i5'/1i3'	TTT GAG AAG GGG TTA TAG GTA G	ACA CAC TAC ATC AAA AAA CCC	1,5	60	294
345-1i5'/1i3'	AAA GGG GTT ATG GGT AAA GG	CAA CCC ATA AAT ACC CTA ATA ACC	1,5	60	259
345-2i5'/2i3'	GCC GAG TGA GGC CAA TGG G	ATC CAG ACC AAA RCC ACC CC	2,5	64	253
34b-1i5'/1i3'	GAG GTT TGG TAT TTT TGG	CTT CTC AAA CAT CTT CTC TC	1,5	55	432
34c-1i5'/1i3'	TAG TTG ATT GTA TTG TGG TGG	CCT AAA AAA AAC TAA CAA TTT AAC	1,5	55	244
369-1i5'/1i3'	GTT GTA GTT TGT GGG GTT TG	CTT CTC AAA TAC CCA AAA TAC C	1,5	60	394
372-1i5'/1i3'	GTT TTA AAT GTG GAG TAT TAT TTT	ACC TCC CAA ATA ACT AAA ACT AC	1,5	60	487
372-2i5'/2i3'	ATT TCC TCA TAA TAT AAA TTT CTT AAC	CAT CTA ACC CAA ATT CCC T	1,5	64	327
375-1i5'/1i3'	GGA AGA TTA GGA TTA GGA GAT T	AAA CCT AAC AAC CCA AAA AC	1,5	60	315
378-1i5'/1i3'	GTA GAG GTY GGA GGG GTT AG	CTT CCC AAA AAT AAC TCT ACC C	1,5	60	317
409-2i5'/2i3'	GAG TAT TTG AGT TTT TTT ATG GTA T	ATC TCC CTT CAA ATA CCA A	1,5	57	329
410-1i5'/1i3'	GTT GTT TTA GTG GGG TTT GG	TAT CAC ACC AAC CCA TAC ATT C	1,5	60	326
412-1i5'/1i3'	GGT ATT AGT ATT ATT TTG GGG TA	TCC TCC AAA ATA AAA TTT AAT AC	1,5	52	258
423-1i5'/1i3'	GAT TTT GTA GGT TTG GGG TAG G	ACA CAA TCC CTT CAC TTC CAA	1,5	63	455

Analyse/Primerpaar	5'-Primer	3'-Primer	MgCl ₂ (mM)	T _{Annealing} (°C)	Produkt (bp)
424-2i5/2i3'	GGG TTT TTT TTA GTT ATT TAG TTT	ACC TAA CCA AAA ATA CTA CCC	1,5	55	329
425-1i5/1i3'	GTA TAG TGG GAG TTT GGT GG	CAA AAT TAA CCC TAT TAA TCC C	1,5	60	284
433-1i5/1i3'	AGG CCA GCA GCA GGG TTT GCC TGG	CAA AAC CCA TTC TAC TTA AAA ACC	1,5	63	442
484-1i5/1i3'	TAG GAT TGT TTG TAA ATT TAT TTT TG	CCA AAA AAA CCA AAA TCA CC	2,5	60	374
503-1i5/1i3'	AAG GTA GAA GGT GGG GTT TG	CAA TCC CAA ACT TAC CCT AAC A	1,5	63	314
560-1i5/1i3'	GTT TTA TTA TGT TGT TAA GGT TTG G	AAC AAA ACA CCT CCA AAT AAA C	1,5	60	452
564-2i5/1i3'	GAG YGA TTT TTA AGG GGT TTG	CAA CAA CAA CAC CAA CAA C	1,5	55	355
565-1i5/1i3'	TTT TGG GGA AAG GTA GAG TAG	CTT TAC AAA ACC CAA TAA TAC ATA	2,5	55	245
572-1i5/1i3'	AGG AAA GTA GGA GGA GGT G	CTT CCA AAA CAA AAC CTA AC	1,5	60	386
572-2i5/1i3'	TTT YGA GAA GAA AGA GTG TGG TT	CTT CCA AAA CAA AAC CTA AC	2,5	60	231
572-4i5/2i3'	GGT GGT TAG TTA ATA TTT GTA GAA T	CCC RAA CCA CAC TCT TT	1,5	60	267
574-2i5/2i3'	TGG TAT AGG GGT GGG ATA AG	CCC TAA CCA CTA CTT CTC ACT AAC	1,5	60	387
594-1i5/1i3'	GTT TTT TAA AGT ATT GGT ATT ATA GG	AAC AAA ATC CAC ATC ACC	2,5	60	417
596-1i5/1i3'	TAT TAT AGT TTT ATA GGT AGG GTT GTT	CAA AAA CAA TAA CCT AAA CAA CA	2,5	60	275
611-1i5/1i3'	TTT GTT TAG GGT ATT GTA GGA TGG	CAA AAC TAC AAA TCC CTC AAT ACC	2,5	60	452
615-1i5/1i3'	AGG GAT TTG AAG GGT GAG	CCA AAC AAA AAA CTT TCC AC	1,5	60	270
632-1i5/1i3'	GAG ATT AAT TTA TTT GGT TTA GTA TTT A	CAC TTT CCC AAC CCA AC	2,5	60	454
637-1i5/1i3'	GGA GTG GGT TTG TGT TTT ATG	CTC AAA AAT ATA AAT AAC CCA AAC AC	1,5	55	341
638-1i5/1i3'	GTT AGA GTT GTT ATT TGG ATT TGT	AAC ACC ACC CCT AAA ACC	1,5	65	307
639-1i5/1i3'	GGT AGA GAT TTT TTT TGG ATT G	TAC TTC ATA ACT CCC TCC CAC	2,5	60	344
656-1i5/1i3'	GTT GTT TTA GTG GGG TTT GGT	CTA ACA TCT TCC CCA AAA TCC	1,5	60	412
658-1i5/1i3'	AGG TTG AGG TAG GAG AAT TGT T	ACA ACC ACA ACA ACC AAA CA	1,5	64,4	339
658-2i5/2i3'	GAG GTT TAG GYG GTT AGG TT	CTC CRC ATC CTA CTA CCA C	1,5	65	267
659-1i5/1i3'	AGA AAG AAT GTT ATA TAA AAG ATG GT	ACC TCT ACC TCT CAA ATT CCA	1,5	60	383
661-1i5/1i3'	TGG AGG TTA TTT GGG TTT AGA T	CTC CTA AAA TCC CAA AAA TCT AA	2,5	60	424
663-1i5/1i3'	GTT TGT AGA GGA ATT TTT TTT AGT T	ACC ACA ACC ACA AAC TCA AC	1,5	64	443
675-1i5/1i3'	TAG GAT AGA GGG GTT TTT AGT TGT TA	CCA AAT CCA CTA TAA ACC CTC TCC	1,5	60	302
760-1i5/1i3'	TTA TTG YGG GTA TTG GAA ATT TGT	CCA AAA CCR AAT TTC TAA AAT ATC C	2,5	60	387
7a-3-1i5/1i3'	TGG TTA TAA TGT TTT TAT TTT TAG GG	CCC AAC CAA AAT TCC AAA C	1,5	55	332
7i-2i5/2i3'	GGT TAT GTT TTG GTT GTT GTT TG	CAC CAA CTA ATT CTA AAC TAC CCC	1,5	65	277
886-3i5/3i3'	TTT TTT AGT GGG TGG ATT TTG TT	ACC CCA ACA CAA AAA TAA ACA A	2,5	60	290
9-1-1i5/1i3'	TTG TAT TTT TTG GTG TTG GTT AG	CTC ATA TCC CTT CCC TCC TAC	1,5	64	308
9-1-3i5/3i3'	GGA GGT TAA GAG TAG GGT AGT TT	CAC CCA AAA TTA TAA AAA TAA CC	1,5	60	337
9-1-4i5/4i3'	GGG AGG TTT TTG TTT GGG T	CAA CAA CAA AAA CCT CAA ACA C	1,5	65	251

Analyse/Primerpaar	5'-Primer	3'-Primer	MgCl ₂ (mM)	T _{Annealing} (°C)	Produkt (bp)
92b-3i5'/2i3'	GAT ATA GGT TGG AAA GAA TAT	CTC CCA AAC CCA CTT ACT C	1,5	57	260
9-3-1i5'/1i3'	GTG TGT TTG TTT ATT TTT TTT GG	AAA ACT AAC ACT ACA AAT ATC CCC	2,0	58	395
933-1i5'/1i3'	TAG TAG GGT TGG AGA TTG TAG GGA	CCR AAA ACC TCT AAA CTA ACC CAA	2,5	60	344
MSP					
mir34aM1/M2.r***	GGT TTT GGG TAG GCG CGT TTC	TCC TCA TCC CCT TCA CCG CCG	1,5	65	122
mir34M3/M5.r***	TTT IGA TTT TTT TTT CGT ATC GAC G	AAA CCC CIA AAC CGC GAC GCG	1,5	60	190
mir34U1/U2.r***	IIG GTT TTG GGT AGG TGT GTT TT	AAT CCT CAT CCC CTT CAC CAC CA	1,5	65	126
mir34U3/U5.r***	GGT TTI GAT TTT TTT TTT GTA TTG ATG	CCA AAC CCC IAA ACC ACA ACA CA	1,5	60	194
MSP-9-3-ms/mas**	GGT GTT AGG ACG TAC GGA AC	TAC CCG AAT CCT AAA ACG C	1,5	60	162
MSP-9-3-us/aus**	GGT GTT AGG ATG TAT GGA AT	TAC CCA AAT CCT AAA ACA C	1,5	60	162
MSP-148a-ms/mas**	TAG GGG AGG TTT CGT AAA GC	CAC GAA AAC GAA TAT TCG AAA	1,5	60	117
MSP-148a-us/aus**	TTT TAG GGG AGG TTT TGT AAA GT	ACA CAA AAA CAA ATA TTC AAA ACT	1,5	57	117
MSP-mir-124a1-ms/mas*	AAA GAG TTT TTG GAA GAC GTC	AAT AAA AAA CGA CGC GTA TA	1,5	57	152
MSP-mir-124a1-us/aus*	AAT AAA GAG TTT TTG GAA GAT GTT	AAA AAA ATA AAA AAC AAC ACA TAT AC	1,5	57	152
MSP-mir-124a3-ms/mas*	GCG AGG ATT TTA CGT AAG TTC	CCG CGT ACC TTA ATT ATA TAA	1,5	60	136
MSP-mir-124a3-us/aus*	GGG TGA GGA TTT TAT GTA AGT TT	TTC ACC ACA TAC CTT AAT TAT ATA AAC	1,5	60	136
Pyrosequenzierung					
1-1-2i5'/3i3'-tail	TGG GGT TAA ATT TAT TTT GAA TTT G	[GGG ACA CCG CTG ATC GTT TA] CTC CTA ACC CTA AGR TAA CTA AAA AAA C	2,5	60	144
1-1 pyro1	GGG GGT AGG GAT TTT	n/a	n/a	n/a	n/a
124-1-2i5'/2i3'-tail	GAG YGA GAG GAT TGT AGT AGG	[GGG ACA CCG CTG ATC GTT TA] ACA ACA TCA ACC CCA CCT C	1,5	65	316
124-1 pyro3	TTT TAG GTT TTA GTT TTG GAT	n/a	n/a	n/a	n/a
124-2-2i5'/2i3'-tail	GTT TTT TAG GGG YGT ATT TTG G	[GGG ACA CCG CTG ATC GTT TA] CCT CAA CCA ATA ACC ACA ATC TA	2,5	63	295
124-2 pyro5	GGT TTT TGY GTA AGA TTA G	n/a	n/a	n/a	n/a
124a3-1i5'-/2i3'	[GGG ACA CCG CTG ATC GTT TA]A AAG GGG AGA AGT GTG G	CAT ACC TTA ATT ATA TAA ACA TTA AAT C	1,5	55	271
124a-3 pyro1	AAA CCC TCA AAA CTA AAA C	n/a	n/a	n/a	n/a
148a-2i5'/2i3'-tail	GAA TTT TAA AGA GTG GGT GGG TG	[GGG ACA CCG CTG ATC GTT TA] CCA ACC ATT CCC AAT ACT CTA TTC	1,5	60	133
148a pyro2	GGA GGG GAT GGG A	n/a	n/a	n/a	n/a
34a1i5'-tail/1i3'	[GGG ACA CCG CTG ATC GTT TA]G GGA TTT YGG TTT TGG GTA G	AAT CCT AAT CCT CAT CCC CTT C	1,5	60	158
34a pyro2-R	TCC TCA TCC CCT TCA C	n/a	n/a	n/a	n/a
596-2i5'/1i3'-tail	TTT YGT TTA GTA GTT TGA TTG AGG	[GGG ACA CCG CTG ATC GTT TA] CAA AAA CAA TAA CCT AAA CAA CA	2,5	60	262
596 pyro3	TTA GTG AGT TTT GAG GAA	n/a	n/a	n/a	n/a
663-3i5'-tail(n)/3i3'(n)	[GGG ACA CCG CTG ATC GTT TA] TTT TTT YGA GTA AGG GGA GGA TTT	AAA CTC AAC RCC AAA ACC ACA T	2,5	65	330
663 pyro1	CTT TCC CAA AAC CAA AC	n/a	n/a	n/a	n/a
9-1-6i5'/4i3'-tail	GGG AAA TGG GGT ATT AGA AAT TTT	[GGG ACA CCG CTG ATC GTT TA] CAA CAA CAA AAA CCT CAA ACA C	1,5	60	140

Analyse/Primerpaar	5'-Primer	3'-Primer	MgCl ₂ (mM)	T _{Annealing} (°C)	Produkt (bp)
9-1 pyro7	TTT TTG GGT TTG GAT	n/a	n/a	n/a	n/a
9-2-2i5/3'-tail	GGA AGA GAT GTT GAT TGA GAA AA	[GGG ACA CCG CTG ATC GTT TA] TAA TCA ACC AAC TAC CCC AC	1,5	60	114
9-2 pyro1	GGG ATT GTT GTA ATG TTG	n/a	n/a	n/a	n/a
9-3-2i5/3'-tail	TTG AAT GGG AGT TTG TGA TTG	[GGG ACA CCG CTG ATC GTT TA] CAT TTC TCC CCT ACT CCC C	1,5	65	226
9-3 pyro2	TGG ATT GAY GTT ATT TTT T	n/a	n/a	n/a	n/a
univ-bio	5'-Biotin-[GGG ACA CCG CTG ATC GTT TA]	n/a	n/a	n/a	n/a
qRT-PCR (ACTB-Test)					
1M5'/1M3'	TGG TGA TGG AGG AGG TTT AGT AAG	AAC CAA TAA AAC CTA CTC CTC CCT TAA	4,5	60	133
Sonde ACTB	6FAM-ACC ACC ACC CAA CAC ACA ATA ACA AAC ACA- TAMRA		n/a	n/a	n/a
qRT-MSP					
ACTB-1M5'/1M3'	TGG TGA TGG AGG AGG TTT AGT AAG	AAC CAA TAA AAC CTA CTC CTC CCT TAA	1,5	65	133
MIR-34-MD/MR†	GTT CGT TGG TTT AGT TAC GC	GAC TAC AAC TCC CGA ACG AT	1,5	65	180
Nested PCR					
mir-9-1 FEF cDNA2 5'/3'	GAT AAC CAA AGA TAA CAA CCA ACC	ACC CTG GGC TCG ATG TAA G	1,5	64,5	1166
mir-9-1 FEF cDNA2n 5'/3'	GGA GTA GGA GGG AAG GGA CA	ACC CTG GGC TCG ATG TAA GT	1,5	64,5	1037
mir-9-1 FEF cDNA1 5'/cDNA3 3'	TGA AGA CTC CAC ACC ACT CA	AAA TGG GGC ACC AGA AAC TT	1,5	65	354
mir-9-1 FEF cDNA1 5'/3'	TGA AGA CTC CAC ACC ACT CA	CGT GTC CCT TCC CTC CTA CT	1,5	60	167
5'-RACE					
mir-9-1 GSP1-FEF	CGG AGA TAC AGA CAC GA	n/a	2,5	60	n/a
mir-9-1 GSP2-FEF/5'-RACE Abridged Anchor Primer††	CGT CCT TTC CAC GCC TTT TT	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG	1,5	55	n/a
mir-9-1 GSP3-FEF/ Abridged Universal Amplification Primer††	GGG TCT GGA TCG GGG TCA A	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC	1,5	55	170
control GSP1††	TTG TAA TTC ATT AAG CAT TCT GCC	n/a	2,5	60	n/a
control GSP2††/5'-RACE Abridged Anchor Primer††	GAC ATG GAA GCC ATC ACA GAC	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG	1,5	55	711
control GSP3††/Abridged Universal Amplification Primer††	CGA CCG TTC AGC TGG ATA TTA C	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC	1,5	55	500
mir-9-1 GSP1A	GGG GTT ATT TTT ACT TT	n/a	2,5	60	n/a
mir-9-1 GSP2A/5'-RACE Abridged Anchor Primer††	GCC AAT AGA TCG AAA TAC TT	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG	1,5	55	n/a
mir-9-1 GSP3A/Abridged Universal Amplification Primer††	CCA CAC CAC TCA TAC AGC TA	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC	1,5	55	n/a
mir-9-1-GSP1 Lujambio**	AAG GGA CAC GAG TGG AGT TG	n/a	2,5	60	n/a
mir-9-1-GSP2 Lujambio**/5'-RACE Abridged Anchor Primer††	GGG GAG GGT GAA GAG AGA AA	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG	1,5	55	n/a
mir-9-1-GSP3 Lujambio**/ Abridged Universal Amplification Primer††	ACG ACA GAG ACC GAA AAA GG	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC	1,5	55	232

* (Lujambio et al., 2007)

** (Lujambio et al., 2008)

*** (Lodygin et al., 2008)

† (Roman-Gomez et al., 2009)

††Invitrogen, 2004, Cat.No.

18374-058

Y= Pyrimidinbase (C/T)

R= Purinbase (A/G)

Tabelle 3 Verwendete Oligonukleotide. Name, Sequenz und Reaktionsbedingungen.

3 Methoden

Sämtliche im Kapitel 3 verwendeten Materialien sind im Kapitel 2 Material aufgeführt.

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Nukleinsäureextraktion aus Kryomaterial

3.1.1.1 Mikrotomschnitte der Kryoproben

Der erste Schritt der Probenaufarbeitung ist für DNA- und RNA-Extraktionen gleich, da diese simultan durchgeführt wurden. Von den bei -80°C gelagerten Proben wurden am Kryostat-Mikrotom $5\mu\text{m}$ dicke Schnitte abgetragen, indem diese mit Kältespray und einem Tropfen Aqua bidest. auf der gekühlten Objekthalterung fixiert wurden. Die Schnitte wurden im mindestens -20°C kalten Arbeitsraum des Kryostat-Mikrotoms in vorgekühlten 2ml Reaktionsgefäßen gesammelt. Es sind zu jedem Fall Referenzschnitte anfertigt worden, die direkt auf einen Objektträger gebracht und mit 70% Ethanol fixiert wurden. Daraufhin wurden diese Schnitte im Eingangslabor Hämatoxylin-Eosin gefärbt (Luna, 1960) und zur histopathologischen Reevaluation an einen diagnostisch tätigen Pathologen weitergeleitet.

3.1.1.2 Nukleinsäureextraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

Aufgrund der differentiellen Löslichkeit von DNA, RNA und Proteinen können diese Molekülgruppen mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol voneinander getrennt werden. Dies kann durch die Denaturierung der Proteine mit Phenol und Chloroform geschehen. Durch den Isoamylalkohol, der als RNase-Inhibitor wirkt, wird außerdem die Bildung von Bläschen verhindert. Die präzipitierten Proteine bilden eine Interphase zwischen der wässrigen, DNA- und RNA-haltigen Phase und der hydrophoben phenoli-

schen Phase. Aus der hydrophilen Phase können in einem weiteren Schritt die Nukleinsäuren ausgefällt werden.

3.1.1.3 DNA-Extraktion aus Kryomaterial

Je nach Größe des Präparates wurden zwischen 5 und 15 Schnitte in einem 2ml *safe lock* Reaktionsgefäß gesammelt, zu denen anschließend 750µl Proteinase-K-Puffer und 25 µl Proteinase K (Konzentration: 0,2 mg/ml) gegeben wurden; bei größeren Proben ist diese Mengen entsprechend erhöht worden. Die Reaktion wurde über Nacht bei 55°C im Schüttelinkubator bei 500rpm inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Proben kurz anzentrifugiert (1min bei 13.000rpm (16.100g), RT) und 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) hinzu gegeben, 30min im Überkopfschüttler durch Kippen gemischt und 10min bei 13.000rpm (RT) zentrifugiert. Bei diesem Schritt wurden Proteine, erkennbar als weißes Präzipitat, ausgefällt. Der Überstand enthält hauptsächlich Nukleinsäuren (DNA und RNA). Der DNA-haltige Überstand wurde abgenommen und erneut mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt. Diese Schritte wurden so lange wiederholt, bis keine weiße Interphase mehr zu erkennen war. Als nächstes wurden 5µl RNase A (Stammlsg. 10 mg/ml) hinzu gegeben und 30min bei 37°C im Schüttelinkubator bei 500rpm inkubiert. Der RNase-Verdau wurde kurz anzentrifugiert und eine weitere Phenol/Chloroform Extraktion zur Entfernung der RNase durchgeführt. Zu dem klaren, DNA-haltigen Überstand wurde ein Volumen Chloroform gegeben und 30min im Überkopfschüttler gemischt. Anschließend wurden die Proben 3min bei 13.000rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert und der DNA-haltige Überstand in ein neues 2ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Reinigung der DNA durch Fällung wurde 1/10 Volumen 3M Na-Acetat (pH 7,0) mit 100µg/ml Dextran und 2½ Volumina 100% Ethanol gegeben und durch Kippen gemischt. Bei hohen Konzentrationen fiel die DNA hierbei "medusenartig" aus. Die DNA wurde mit einer Mikroliterpipette vorsichtig angesaugt und in einem 1,5ml Reaktionsgefäß mit ⅔Volumen 70% Ethanol durch Schwenken gewaschen. Daraufhin wurde die präzipitierte DNA in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß mit 50-200µl TE-Puffer, je nach Größe des Präzipitates, überführt und über Nacht bei 4°C gelöst.

Falls die DNA im Anschluss immer noch nicht komplett gelöst war, wurde entweder zusätzlicher TE-Puffer hinzugegeben oder das Präzipitat für 30min bei 37°C inkubiert.

Es wurde nun die Absorption der DNA am Spektralphotometer ($\lambda=260\text{nm}$) zur Konzentrationsbestimmung gemessen.

Sollte die DNA nicht "medusenartig" präzipitiert sein, so wurden die jeweiligen Proben mit 1/10 Volumen 3M Na-Acetat (pH 7,0) mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Dextran und 2 $\frac{1}{2}$ Volumina 100% Ethanol über Nacht bei -20°C zur Fällung gelagert. Daraufhin wurde die gefällte DNA 20min bei 13.000rpm und 4°C abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde nun mit $\frac{2}{3}$ Volumen 70% Ethanol für 5min bei 13.000rpm und 4°C gewaschen, anschließend für 5min luftgetrocknet und je nach Größe in 50-100 μl TE-Puffer gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4°C .

3.1.1.4 RNA-Extraktion aus Kryomaterial und Zelllinien

Alle Arbeiten wurden mit vorgekühlten Lösungen auf RNase-freien Flächen und auf Eis ausgeführt. Je nach Größe des Präparates sind zwischen fünf und 15 Gewebeschnitte mittels Ultra-Turrax T8 von IKA-Labortechnik (5mm/8mm Messer, S8N-8G 1) in 1 ml *TRIzol*®, bei größeren Proben bis zu 2ml, mit 1/1000 Vol LPA von SIGMA schnellstmöglich bei 4°C in einem 2ml *safe lock* Reaktionsgefäß homogenisiert und dann 10min bei RT inkubiert worden. Das Messer des Ultra-Turrax wurde vor jedem Kontakt mit Probenmaterial gründlich mit Aqua bidest., 70% Ethanol und *TRIzol*® gespült. Die Zellen der Zelllinien waren bereits in 1ml *TRIzol*® gelöst. Pro 1ml *TRIzol*® wurden 200 μl Chloroform hinzu gegeben, der Reaktionsansatz anschließend gevortext und 10min bei RT absetzen gelassen. Die Proben wurden 15min bei 13.000 rpm (16.100g) und 4°C zentrifugiert, sodaß die wässrige, RNA-haltige Phase des Überstandes abgenommen und in ein neues 2ml Reaktionsgefäß überführt werden konnte. Es wurden 500 μl Isopropanol pro 1ml *TRIzol*® hinzu gegeben, gevortext und bei -20°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Proben 20min bei 13.000rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das gelartige RNA-Pellet wurde mit 500 μl 70% Ethanol gewaschen (5min bei 13.000rpm, 4°C) und gevortext. Anschließend ist der Überstand möglichst vollständig abgenommen worden. Das RNA-Pellet wurde in 90 μl DEPC-Wasser gelöst und 1/10 Volumen 3M NaAcetat (pH 5,2) + 2 $\frac{1}{2}$ Volumen 100% Ethanol hinzugegeben und die RNA bei -20°C über Nacht gefällt.

Am nächsten Tag wurden die Proben 20min bei 13.000rpm und 4°C abzentrifugiert, das RNA-Pellet mit 500 μl 70% Ethanol durch Vortexen gewaschen und 5min bei 13.000rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen

und das RNA-Pellet kurz an der Luft trocknen gelassen. Je nach Größe des Pellets wurde die RNA in 50-150µl DEPC-Wasser gelöst. Die RNA wurde für wenige Wochen bei -20°C bis -80°C gelagert; zur Langzeitlagerung ist die RNA mit 1/10Volumen 3M NaAcetat (pH 5,2) und 2½Volumen 100% Ethanol gefällt, kurz gevortext und in Fällung bei -80°C gelagert worden.

3.1.2 Nukleinsäureextraktion aus FFPE-Material

3.1.2.1 DNA-Extraktion aus formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe

Es wurden je FFPE-Block fünf bis sieben 15µm dicke Schnitte bei RT abgenommen und in ein 1,5ml *safe lock* Reaktionsgefäß überführt. Vor jedem neuen Block wurde die Mikrotomklinge mit Xylolersatz gereinigt. Je nach Größe des Patientematerials sind 500-1000µl Proteinase K-Puffer + 1/100Volumen Proteinase K hinzugegeben und durch Vortexen vermischt worden. Die Inkubation des homogenisierten Ansatzes erfolgte über Nacht im Schüttelinkubator bei 1400rpm und 55°C. Die Proben wurden dann für 5min bei 13.000rpm und 4°C abzentrifugiert. Danach konnte mit einer Pipettenspitze durch die gebildete Paraffinkappe gestochen werden und 1ml Überstand ohne Berührung des Bodensatzes abgenommen, mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und zur Homogenisation gevortext werden. Die Homogenisate wurden 15min bei 13.000rpm (16.100g) und Raumtemperatur zentrifugiert. Der DNA-haltige, klare Überstand über der weißen Protein-Interphase wurde abgenommen und in ein neues 2ml Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurde 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben, 30min im Überkopfschüttler durch Kippen gemischt und 10min bei 13.000rpm (RT) zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand über dem weißen Proteinpräzipitat wurde abgenommen und erneut mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt. Diese Schritte wurden so lange wiederholt, bis keine weiße Interphase mehr zu erkennen war. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Volumen Chloroform versetzt, gevortext und 3min bei 13.000rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 5µl RNase A (Stammlsg. 10mg/ml) hinzugegeben und 30min bei 37°C im Schüttelinkubator bei 800rpm inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde kurz anzentrifugiert (1min bei 13.000rpm, RT) und eine erneute Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion durchgeführt. Zu dem kla-

ren Überstand wurde 1 Volumen Chloroform gegeben, der Ansatz gevortext und für 3min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der klaren Überstand wurde in ein neues Tube überführen und mit 1/10 Volumen 3M NaAcetat (pH 7,0) mit 100µg/ml Dextran und 2½Volumen 100% Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Am nächsten Tag sind die Proben 20min bei 13.000rpm und 4 °C zentrifugiert worden, wonach das Pellet mit 500µl 70% Ethanol gewaschen und anschließend gevortext wurde. Die Proben wurden 5 min bei 13.000rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet 5min luftgetrocknet und je nach Größe in 50-100µl TE-Puffer gelöst. Abschließend ist die Absorption der DNA am Spektralphotometer ($\lambda=260\text{nm}$) zur Konzentrationsbestimmung gemessen worden. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.1.2.2 RNA-Extraktion aus formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe

Vor der Benutzung ist das Mikrotom mit Xylolersatz gereinigt worden. Pro Paraffinblock wurden sieben 15µm dicke Schnitte abgenommen und in ein 1,5ml *safe lock* Reaktionsgefäß überführt. Die Mikrotomklinge wurde vor jedem neuen Block mit Xylolersatz gereinigt. Alle Arbeiten sind auf RNase-freien Flächen mit vorgekühlten Lösungen und auf Eis ausgeführt worden. Die Arbeitsfläche unter dem Abzug wurde mit Hypochlorit gereinigt. Zu jeder Probe sind 750µl Digestion Solution (Tabelle 4), 5,5µl β -Mercaptoethanol und 300µl Proteinase K dazupipettiert und gründlich gevortext worden. Die Proben wurden über Nacht im Schüttelinkubator mit 1400rpm bei 55 °C inkubiert.

Reagenz	Menge
Guanidinthiocyanat	100g
1M Tris HCl, pH=7,6	6ml
97% Natrium-N-Lauryl-Sarcosine	4,2ml
DEPC-Wasser	ad 200ml

Tabelle 4 Digestion Solution.

Am nächsten Tag sind die Proben 5min bei 13.000rpm (16.100g) und 4 °C zentrifugiert, 950µl Überstand in ein neues 2ml Reaktionsgefäß gegeben und 100µl 3M Na-Acetat, pH 5,2 dazu pipettiert worden. Die Reaktion wurde gründlich gevortext und 1min bei 13.000rpm anzentrifugiert.

Im nächsten Schritt wurden 630µl saures, wassergesättigtes Phenol hinzugegeben, gründlich gevortext und 1min bei 13.000rpm an zentrifugiert. Als nächstes sind 270µl Chloroform hinzugegeben, der Ansatz gründlich gevortext und zur Phasentrennung mindestens 15min auf Eis stehen gelassen worden. Die Proben wurden 20min mit 13.000rpm bei 4°C zentrifugiert und anschließend 950µl des wässrigen Überstands abgenommen und in ein neues 2ml Reaktionsgefäß überführt. Hierbei verbleiben Proteine und DNA in der weißen Interphase, die RNA befindet sich im wässrigen Überstand. Zu diesem wurde 1µl Glykogen und 1Vol. Isopropanol gegeben und gründlich gevortext. Die Reaktion wurde über Nacht bei -20°C zur Fällung inkubiert.

Am darauf folgenden Tag sind die Proben 20min bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert und gegenüber des nahezu durchsichtigen Pellets der Überstand abgenommen und verworfen worden. Das Pellet wurde anschließend mit 500µl -20°C kaltem, 70% EtOH gewaschen, gründlich gevortext und 5min bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand gegenüber des Pellets abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde unter dem Abzug im Reaktionsgefäß für 5min an der Luft trocknen gelassen und anschließend in 50-150µl 4°C kaltem DEPC-Wasser gelöst. Abschließend ist die Absorption der RNA am Spektralphotometer ($\lambda=260\text{nm}$) zur Konzentrationsbestimmung gemessen worden. Zur Lagerung wurde die RNA wiederum mit 1/10Volumen Na-Acetat (pH 5,2) und 2½Volumen 100% Ethanol gefällt und bei -20°C für einige Wochen oder bei -80°C auf längere Zeit gelagert.

3.1.3 Gesamt-RNA cDNA-Synthese

Zur Untersuchung von microRNA-Primärtranskripten, die ebenso wie mRNAs eine 5'-Kappe besitzen und polyadenyliert sind, wurde zunächst cDNA (complementary DNA) mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase und eines Random-Hexamer-Primers ((p(dN)_6)) synthetisiert. Die Vorbehandlung der RNA mit DNase erfolgte in einem 0,2ml Reaktionsgefäß, in das die folgenden Reagenzien gegeben wurden (Tabelle 5).

Reagenz	Menge
RNA (1µg Gesamt-RNA mit DEPC-Wasser aufgefüllt)	8,5 µl
10x Puffer (RQ1)	1,0 µl
DNase (RQ1)	0,9 µl
gesamt	10,5 µl

Tabelle 5 Reaktionsansatz Gesamt-cDNA-Synthese.

Alle cDNA-Synthesen sind mit einem Biometra TPersonal-Cycler durchgeführt worden. Der Reaktionsansatz wurde 30min bei 37°C inkubiert, danach wurde Stop-Solution hinzugegeben (Tabelle 6), um einen folgenden Abbau der revers transkribierten cDNA zu verhindern.

Reagenz	Menge
DNase Stop Solution (RQ1)	1µl
Primer p(dN)6 (500 ng/µl)	1µl
gesamt	2µl

Tabelle 6 Reaktionsansatz Gesamt-cDNA Synthese II.

Die Reaktion wurde 10min bei 70°C inkubiert und dann 1min bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert. Danach sind folgende Reagenzien zur Verhinderung der Degradation der RNA hinzugegeben worden (Tabelle 7).

Reagenz	Menge
5x Puffer	4µl
DTT 0,1M	2µl
dNTP's (je 10mM)	1µl
RNase Inhibitor	0,5µl
gesamt	7,5 µl

Tabelle 7 Reaktionsansatz Gesamt-cDNA Synthese III.

Die Reaktionsansätze wurden vorsichtig durch Anschnipsen gemischt und 10min bei 25°C inkubiert.

Temperatur	Zeit
42°C	50min
70°C	15min
4°C	Pause

Tabelle 8 Gesamt-cDNA Synthese-Programm.

Im letzten Schritt wurde die Reverse Transkription, durch Zugabe von 0,9µl Super Script (Reverse Transkriptase), durchgeführt (Tabelle 8). Als Negativkontrolle wurde

anstelle des Enzyms DEPC-Wasser verwendet. Die fertige cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Aus Gründen der Kontaminationsvermeidung wurden alle Prä-PCR-Schritte in separaten Räumlichkeiten durchgeführt, strikt getrennt von den Post-PCR Geräten und Arbeitsplätzen.

3.1.4.1 Gradienten-PCR zur Optimierung der Annealing-Temperatur von Primern

Die PCR-Effizienz in unterschiedlichen Laboren hängt in kritischem Maße von vielen Faktoren, wie z.B. der Güte der Reagenzien, des verwendeten Wassers, der eingesetzten Thermocycler und Reaktionsgefäße und dem jeweiligen Experimentator ab. Daher ist eine Optimierung der PCR-Konditionen entscheidend für deren Erfolg. Die Annealing-Temperaturen der PCR-Primer sowie die eingesetzte MgCl_2 -Konzentration sind einfache Faktoren, um eine erfolgreiche PCR zu etablieren.

Es wurde somit eine Primertest-PCR jedes verwendeten Primerpaares durchgeführt, bei der ein Temperaturgradient von 55°C bis 65°C und MgCl_2 -Konzentrationen von 1,5mM und 2,5mM verwendet worden sind. Der Standard-Ansatz für eine Gradienten-PCR für Natriumbisulfit-modifizierte DNA (kDNA) mit 25 μl ist in Tabelle 9 beschrieben.

Reagenz	1x (1,5 mM MgCl_2) Mastermix (μl)	1x (2,5 mM MgCl_2) Mastermix (μl)
PCR-Wasser	17,4	16,4
10x Platinum Taq-Puffer	2,5	2,5
50mM MgCl_2	1,5	2,5
dNTP's (je 10mM)	0,5	0,5
Primermix 5'/3' (10pmol/ μl)	1	1
Platinum Taq Polymerase (5 units/ μl)	0,1	0,1
kDNA	2	2
gesamt	25	25

Tabelle 9 Reaktionsansatz für Gradienten-PCR (kDNA).

Zuerst wurde der Gradienten-PCR-Mastermix ohne kDNA für alle Reaktionen (Anzahl der Proben = n+10% Überschuss) in einem 1,5ml Reaktionsgefäß im PCR-Vorbereitungsraum hergestellt. Im Prä-PCR-Labor wurde die kDNA in die 0,2ml PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt, je Probe 23µl Mastermix hinzugegeben, durch Anschöpfen gemischt und die Reaktionsgefäße bei Bedarf kurz abzentrifugiert (10sec bei 13.000rpm). Alle Gradienten-PCR's sind mit einem Biometra TGradient Thermocycler in einem weiteren separaten Raum durchgeführt worden. Das Gradienten-PCR-Programm ist in Tabelle 10 dargestellt.

Temperatur	Zeit	
95°C	5min	
95°C	30sec	} 40 Zyklen
Gradient 55°C-65°C	45sec	
72°C	45sec	
72°C	7min	
8°C	Pause	

Tabelle 10 PCR-Programm der Gradienten-PCR.

Nach Abschluss der Reaktion wurden 5µl des Gradienten-PCR-Produktes auf einem 6% Polyacrylamidgel analysiert. Anhand der stärksten, diskreten Bande wurden die PCR-Bedingungen für künftige Reaktionen festgelegt.

3.1.4.2 Methylierungsinsensitive PCR (iPCR) für COBRA

Im Gegensatz zur klassischen, qualitativen PCR wird anstelle von unbehandelter genomischer DNA (gDNA) Natriumbisulfit-behandelte, konvertierte DNA (kDNA) verwendet. Deren modifizierte Basensequenz (siehe Konversion) wird in der PCR umgeschrieben, wobei die RNA-Base Uracil durch die DNA-Base Thymin ersetzt wird. Anhand der Sequenzunterschiede in CpG-Dinukleotiden lässt sich in weiteren Analysen erkennen (siehe COBRA, Pyrosequenzierung), ob und zu wie viel Prozent die Allele auf diesem Locus methyliert sind. Um zu vermeiden, dass nur bestimmte Allele amplifiziert werden, sollten die Primer nur auf CpG-Dinukleotid-freie Bereiche gelegt werden, wobei in Ausnahmefällen eine Wobble-Base (5'-YpG-3', 5'-CpR-3') in die Primersequenz eingefügt werden kann. Der Standard-Ansatz für eine iPCR mit 25µl ist in Tabelle 11 beschrieben.

Reagenz	1x (1,5 mM MgCl ₂) Mastermix (µl)	1x (2,5 mM MgCl ₂) Mastermix (µl)
PCR-Wasser	17,4	16,4
10x Platinum Taq-Puffer	2,5	2,5
50mM MgCl ₂	1,5	2,5
dNTP's (je 10mM)	0,5	0,5
Primermix 5'/3' (10pmol/µl)	1	1
Platinum Taq Polymerase (5 units/µl)	0,1	0,1
kDNA	2	2
gesamt	25	25

Tabelle 11 Reaktionsansatz für iPCR (kDNA).

Zunächst wurde der iPCR-Mastermix laut Tabelle 11 ohne kDNA für alle Reaktionen (Anzahl der Proben = n+10% Überschuss) in einem 2ml Reaktionsgefäß im PCR-Vorbereitungsraum hergestellt. Im Prä-PCR-Labor wurde die kDNA in die 0,2ml PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt, je Probe 23µl Mastermix hinzugegeben, durch Anschneipen gemischt und die Reaktionsgefäße bei Bedarf kurz abzentrifugiert (10sec bei 13.000rpm). Alle iPCR's sind mit einem Biometra T1 Thermocycler in einem weiteren separaten Raum durchgeführt worden. Das iPCR-Programm ist in Tabelle 12 dargestellt.

Temperatur	Zeit	
95°C	5min	
95°C	30sec	} 40 Zyklen
60°C	45sec	
72°C	45sec	
72°C	7min	
8°C	Pause	

Tabelle 12 PCR-Programm der iPCR.

Nach Abschluss der Reaktion wurden 5µl des iPCR-Produktes auf einem 6% Polyacrylamidgel analysiert und für die mittelfristige Lagerung (4-6 Wochen) bei -20°C eingefroren, oder für den sofortigen Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

3.1.4.3 Methylierungsinsensitive PCR (iPCR) für Pyrosequenzierungen

Analog zu der Methylierungsinsensitiven PCR für COBRA wird die iPCR für Pyrosequenzierungen bis auf die Verwendung von biotinylierten Primern identisch durchgeführt. Um das entstandene PCR-Produkt an die Streptavidin-gecoateten Sepharose-Beads zu binden, wird ein Biotin-markierter Primer verwendet. Biotin hat eine hohe Affinität zu Streptavidin und bildet deswegen einen idealen "Anker" mit dem sich ein PCR-Produkt an die Sepharose-Beads anheften kann. Um das Verfahren zu vereinfachen, wurde ein Biotin-markierter Primer mit einheitlicher Sequenz verwendet, der komplementär zu dem Anhang (*tail*) der 3'- oder 5'-Primer der iPCR ist. Der Standard-Primermix ist in Tabelle 13 dargestellt.

Reagenz	Volumen (µl)
5'-PCR-Primer (10pmol/µl)	10
universell biotinylierter Primer (10pmol/µl)	10
3'-PCR-Primer-tail (1pmol/µl)	1
PCR-Wasser	79
gesamt	100

Tabelle 13 Standard-Primermix für iPCR's (Pyrosequenzierung).

3.1.4.4 Methylierungsspezifische PCR (MSP)

Die Methylierungsspezifische PCR ist der Methylierungsinsensitiven PCR sehr ähnlich, sie unterscheiden sich lediglich in der Art und Lage der Primer (Herman et al., 1996). Es handelt sich um eine semiquantitative Analysemethode, bei der pro untersuchter Region zwei Primerpaare, die an die selbe Sequenz binden, verwendet werden. Hierbei ist es obligatorisch, dass die Primer möglichst viele CpG-Dinukleotide überspannen, damit ein Unterschied bei der Amplifikation beider Primerpaare festgestellt werden kann. Das M-Primerpaar entspricht der vollständig methylierten Sequenz, daher wird jedes Cytosin in CpG-Dinukleotiden als C in der M-Primersequenz behandelt. Das U-Primerpaar entspricht hingegen der vollständig unmethylierten Sequenz, das heißt jedes Cytosin in CpG-Dinukleotiden wird als T in der U-Primersequenz behandelt. Werden nun beide Primerpaare zur Amplifikation einer Probe verwendet, so ergeben sich zwei unterschiedlich starke Produkte. Die Intensitäten dieser beiden Banden zeigen die

Methylierung der untersuchten Sequenz an. Der Standard-Ansatz für eine MSP mit 25µl ist in Tabelle 14 beschrieben.

Reagenz	1x (1,5 mM MgCl ₂) Mastermix (µl)	1x (2,5 mM MgCl ₂) Mastermix (µl)
PCR-Wasser	17,4	16,4
10x Platinum Taq-Puffer	2,5	2,5
50mM MgCl ₂	1,5	2,5
dNTP's (je 10mM)	0,5	0,5
Primermix M/U (10pmol/µl)	1	1
Platinum Taq Polymerase (5 units/µl)	0,1	0,1
kDNA	2	2
Gesamt	25	25

Tabelle 14 Reaktionsansatz für MSP (kDNA).

Der MSP-Mastermix wurde zunächst laut Tabelle 14 ohne kDNA für alle Reaktionen (Anzahl der Proben = n+10% Überschuss) in einem 2ml Reaktionsgefäß im PCR-Vorbereitungsraum hergestellt. Im Prä-PCR-Labor wurde die kDNA in die 0,2ml PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt, je Probe 23µl Mastermix hinzugegeben, durch Anschöpfen gemischt und die Reaktionsgefäße bei Bedarf kurz abzentrifugiert (10sec bei 13.000rpm). Alle MSP's sind mit einem Biometra T1 Thermocycler in einem weiteren separaten Raum durchgeführt worden. Das MSP-Programm ist in Tabelle 15 dargestellt.

Temperatur	Zeit	
95°C	5min	
95°C	30sec	} 40 Zyklen
60°C	45sec	
72°C	45sec	
72°C	7min	
8°C	Pause	

Tabelle 15 PCR-Programm der MSP.

Nach Abschluss der Reaktion wurden 5µl des MSP-Produktes auf einem 6% Polyacrylamidgel analysiert und für die mittelfristige Lagerung (4-6 Wochen) bei -20°C eingefroren oder für den sofortigen Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

3.1.4.5 PCR zur Kontrolle der Klonierungseffizienz (M13-PCR)

Um festzustellen, ob die amplifizierten 5'-RACE-Fragmente erfolgreich in den TOPO-Vektor ligiert worden sind, wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt. Hierbei ist das Insert aus dem Plasmid amplifiziert worden.

Reagenz	1x (1,5 mM MgCl ₂) Mastermix (µl)
PCR-Wasser	17,4
10x Platinum Taq-Puffer	2,5
50mM MgCl ₂	1,5
dNTP's (je 10mM)	0,5
Primermix M13f/r (10pmol/µl)	1
Platinum Taq Polymerase (5 units/µl)	0,1
Plasmid-DNA	2
gesamt	25

Tabelle 16 Reaktionsansatz für M13-PCR (kDNA).

Der M13-PCR-Mastermix wurde zunächst laut Tabelle 16 ohne Plasmid-DNA für alle Reaktionen (Anzahl der Proben = n+10% Überschuss) in einem 2ml Reaktionsgefäß im PCR-Vorbereitungsraum hergestellt. Im Prä-PCR-Labor wurde die kDNA in die 0,2ml PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt, je Probe 24µl Mastermix hinzugegeben, durch Anschnipsen gemischt und die Reaktionsgefäße bei Bedarf kurz abzentrifugiert (10sec bei 13.000rpm). Alle M13-PCR 's sind mit einem Biometra T1 Thermocycler in einem weiteren separaten Raum durchgeführt worden. Das M13-PCR-Programm ist in Tabelle 17 dargestellt.

Temperatur	Zeit
95°C	5min
95°C	30sec
55°C	45sec
72°C	45sec
72°C	7min
8°C	Pause

} 40 Zyklen

Tabelle 17 PCR-Programm der M13-PCR.

Nach Abschluss der PCR wurden 5µl PCR-Produkt mit 1µl 6x Ladepuffer versetzt und auf ein 6% PAA-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit einer Spannung von 12V/cm² bis etwa 7/8 der Laufstrecke (blaue Bromphenolblaubanden). Das Gel wurde im Ethidiumbromidbad gefärbt und fotografiert. Die Fragmentgröße sollte sich wie folgt zusammensetzen: Genfragment + 133bp TOPO-Vektor + 33bp M13-f/r-Primer. Die in der PCR positiv getesteten Plasmide wurden abschließend sequenziert, um die klonierte Sequenz zu verifizieren.

3.1.5 DNA-Methylierungsanalysen

3.1.5.1 Natriumbisulfit-Konversion mit dem EZ DNA-Methylation Kit

Die Natriumbisulfit-Konversion dient der Desaminierung von nichtmethyliertem Cytosin zu Uracil, wobei methyliertes Cytosin in CpG-Dinukleotiden von dieser Behandlung nicht betroffen ist, sodass bei der konvertierten DNA ein Sequenzunterschied erkennbar wird.

Vor Beginn der Arbeiten wurde das CT Conversion Reagent-Konzentrat mit 750µl Wasser und 210µl M-Dilution Buffer gemischt, indem der Ansatz für 2min gevortext und für 15min bei 37°C inkubiert worden ist. Je Probe wurde 1µg DNA-Lösung mit 5µl M-Dilution-Buffer gemischt und auf 50µl mit Aqua bidest. aufgefüllt. Die Reaktion ist nun bei 37°C für 15min inkubiert worden. Im Anschluss wurden 100 µl CT Conversion Reagent hinzugegeben, die Reaktion leicht gevortext und im Dunkeln über Nacht für 16 Stunden bei 50°C inkubiert.

Am nächsten Tag sind die Proben für 10min auf Eis inkubiert worden, danach wurden 400µl M-Binding Buffer hinzugegeben und durch Pipettieren gemischt. Die Proben wurden auf eine Zymo-Spin I Column geben und in einem 2ml Röhrchen ohne Deckel 30sec bei 13.000rpm (16.100g) und Raumtemperatur zentrifugiert. Es sind darauf 200µl M-Wash Buffer hinzugegeben, 30sec bei 13.000rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und der Durchlauf verworfen worden. Es wurden nun 200 µl M-Desulfonation Buffer hinzugegeben und die Reaktion für 15min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben 30sec bei 13.000rpm und RT zentrifugiert, 200 µl M-Wash Buffer hinzugegeben und wiederum 30sec bei 13.000rpm und RT zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde einmal wiederholt. Darauf hin wurde die Zymo-Spin I Column in ein 1,5ml Reaktionsgefäß eingesetzt, 25µl M-Elution Buffer hinzugegeben und 30sec bei

13.000rpm und RT abzentrifugiert. Der Elutionsschritt ist wiederholt worden, um die Ausbeute an eluierter DNA in den 50µl Gesamtvolumen zu maximieren. Die DNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

3.1.5.2 Methylierungsspezifischer Restriktionsverdau (COBRA)

Bei diesem Verfahren (COBRA: Combined Bisulfite Restriction Aalysis) können die Veränderungen der Sequenzen methylierungssensitiver Restriktionsschnittstellen semiquantitativ nachgewiesen werden (Xiong and Laird, 1997). Der Restriktionsverdau zeigt, ob die Sequenz von bestimmten RE-Stellen verändert ist (z.B. CGCG [Bsh1236I] zu TGTG; keine Schnittstelle). Darauf hin zeigen sich nach erfolgter Elektrophorese auf dem Gel unterschiedlich starke Banden der Restriktionsprodukte. Diese Bandenintensitäten können quantifiziert werden und geben Aufschluss auf den Methylierungsgrad der untersuchten Allele.

Die DNA-Konversion, das heißt die Deaminierung von nichtmethyliertem Cytosin zu Uracil, wurde mit dem EZ DNA Methylation Kit durchgeführt. Dieser konvertierte DNA-Abschnitt (kDNA) wurde daraufhin in einer methylierungsinsensitiven PCR (iPCR) amplifiziert und das Produkt auf einem 6% Polyacrylamidgel analysiert. Im Anschluss wurde das verbleibende PCR-Produkt zur COBRA verwendet. Die in Tabelle 18 aufgeführten Reagenzien wurden in ein 0,2ml *safe lock* PCR-Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden die Reaktionen kurz durch Anschnipsen gemischt und 30sec bei 13.000rpm anzentrifugiert.

Reagenz	Volumen (µl)
iPCR-Produkt	6
10x Puffer	1,5
Enzym	0,5
Aqua bidest.	7
gesamt	15

Tabelle 18 Reaktionsansatz der COBRA.

Der Restriktionsverdau erfolgte für 90min bei dem enzymespezifischen Temperaturoptimum in einem Biometra T1 Thermocycler. Nach der Inkubation wurden die Reaktionsgefäße kurz anzentrifugiert und daraufhin zur Analyse auf ein 6% Polyacrylamidgel aufgetragen.

Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in Tabelle 19 dargestellt.

Restriktionsenzym	Schnittstelle	10x Puffer	Temperatur (°C)
Bsh1236I (10u/μl)	5'...C G [^] C G...3' 3'...G C [^] G C...5'	R	37
Tail (10u/μl)	5'... A C G T [^] ...3' 3'... [^] T G C A ...5'	R	65
TaqI (10u/μl)	5'...T [^] C G A...3' 3'...A G C [^] T...5'	TaqI	65

Tabelle 19 Temperaturoptima und Reaktionspuffer der Restriktionsenzyme für COBRA.

3.1.5.3 Pyrosequenzierung zur Methylierungsanalyse

Mit dem PyroMark MD (Biotage) können sowohl CpG-Dinukleotid-Methylierungsanalysen als auch einfache Sequenzierungen zur SNP-Analyse durchgeführt werden. Bei der Methylierungsanalyse werden vorab definierte Bereiche eines iPCR-Produktes unter Zuhilfenahme eines individuellen Primers sequenziert, wobei bei jedem CpG-Dinukleotid sowohl Cytosin als auch Thymin in die Wells der PSQ-Platte injiziert werden, um die prozentuale Verteilung der Allele (C und/oder T) zu ermitteln (Lehmann, in press).

Mastermix		PCR Produkt	
Reagenz	Volumen (μl)	Reagenz	Volumen (μl)
Binding Puffer	47	PCR-Produkt	5-20
Streptavidin-Sepharose-Beads	3	HPLC-Wasser	25-10
gesamt	50	gesamt	30
Gesamtvolumen	80		

Tabelle 20 Ansatz von Mastermix und PCR-Produkt für Pyrosequenzierung.

Vor Beginn der Arbeiten wurde der PyroMark MD mit der Pyro Q-CpG-Software gestartet. Die Pufferbäder wurden mit 1. 70% Ethanol, 2. 0,2M NaOH, 3. 1x Waschpuffer und 4. Aqua bidest. gefüllt und der Heizblock mit Thermoplatte auf 80°C vorgeheizt. Zum

Vorbereiten der PCR-Platte wurden in jedes Well der entsprechende Mastermix und das verdünnte PCR-Produkt vorgelegt (Tabelle 20).

Die PCR-Platte wurde 5min bei RT auf einem H+P Magnetschüttler Monoshake geschüttelt, während die PSQ-Platte vorbereitet wurde. Je Well wurden die folgenden Reagenzien vorgelegt (Tabelle 21):

Reagenz	Volumen (μ l)
Annealing Puffer	11,5
Sequenzierprimer in HPLC-Wasser (10 pmol/ μ l)	0,5
Gesamtvolumen	12

Tabelle 21 Ansatz Sequenzierprimer für Pyrosequenzierung.

Zur Vakuum-Präparation wurden die PCR- und die PSQ-Platte auf die Vakuumpräp-Station gelegt, die Filterspitzen erst kurz mit Wasser gespült und dann die Beads vorsichtig aus der PCR-Platte angesaugt. Die angesaugten Beads wurden erst mit 70% Ethanol für 5sec, dann mit 0,2M NaOH-Lösung für 10sec und schließlich mit Waschpuffer für 15sec gespült. Der Ansaugkopf wurde über der PSQ-Platte platziert, bevor das Vakuum abgestellt wurde. Mindestens 5sec, nachdem der Druckunterschied auf dem Manometer auf Null gefallen war, wurden die Filterspitzen in den vorgelegten Ansatz getaucht und die Beads vorsichtig für 15sec abgeschüttelt. Zum Abschluss sind die Spitzen erneut mit Wasser gespült worden.

Die PSQ-Platte wurde 2min bei 80°C auf dem Heizblock inkubiert und zum Annealing der Sequenzierprimer 10 min bei RT abkühlen gelassen.

Währenddessen wurde der Pyrolauf eingerichtet. Hierzu sind in der Pyro Q-CpG-Software ein neuer Lauf eingerichtet, die entsprechenden Pyroassays ausgewählt und die Plattenbelegung eingetragen worden. Bei *Instrument Parameters* wurde *MD or HS(A) Code 0002 CDT* ausgewählt, da alle Läufe mit CDT-Kartuschen mit größerer Kapillaröffnung durchgeführt wurden. Schließlich wurden unter *Tools, Volume Information* die benötigten Volumina an Enzym, Substrat und Nukleotiden zur Befüllung der Kartuschen ermittelt und die Datei gespeichert. Die Kartuschen wurden zunächst zweimal mit Aqua bidest. gespült, indem mit der Fingerkuppe auf den Wassermeniskus der Kartuschenöffnung gedrückt wurde, bis ein schwacher Wasserstrahl an der Unterseite herausspritzte. Die Kartuschen wurden vollständig entleert und verbleibende Wassertropfen herausgeschleudert.

Um Luftblasen zu vermeiden wurden die Kartuschen über die untere Innenseite befüllt und vorsichtig angeschnipst, um etwaig doch entstandene Luftblasen zu entfernen. Die Kartuschen wurden in alphabetischer Reihenfolge in den Kartuschenhalter eingesetzt. Auf die beiden Positionen hinten von links nach rechts sind Enzym und Substrat, auf die vier Positionen vorne von links nach rechts A, C, G und T eingesetzt worden. Die Klappe des Pyrosequencers und die Prozesskammer wurden geöffnet und eine leere, mit Folie abgedeckte PSQ-Platte zum Dispensationstest vor jedem Lauf ins Gerät gestellt. Der Kartuschenhalter mit den Reagenzien wurde eingesetzt (Ausrichtung Enzym und Substrat nach hinten), gesichert und die Prozesskammer und der Pyrosequencer geschlossen worden. Im Menü der Pyro Q-CpG-Software wurde *Instrument, Dispensation Test* ausgewählt und nach Beendigung des Tests die PSQ-Platte aus dem Gerät herausgenommen. Nach der Überprüfung, ob sich jeweils ein klar begrenzter Enzym/Substrat/Nukleotid-Tropfen (insgesamt 6 Tropfen) in der Mitte der Platte befand, wurde die PSQ-Probenplatte ins Gerät gestellt und der Lauf gestartet, ansonsten mussten alle verstopften Kartuschen erneut gespült oder ausgetauscht werden.

Nach dem Lauf wurde das Ergebnis analysiert, indem *Analyse All* verwendet wurde. Unter *Reports* wurde *Pyrogram* ausgewählt und der gewünschte Bereich (*All wells, Number of rows: 4*) wurde ausgedruckt. Die benutzten Kartuschen wurden erneut gespült und die Pufferbäder entleert und mit Aqua bidest. gewaschen. Der Pyrosequencer wurde über die Software abgeschaltet und die maximale Füllhöhe des Kanisters der Vakuumprep-Station überprüft. Die Dispensationstest-Platte konnte wieder verwendet werden, indem sie mit einem Zellstofftuch trocken gewischt wurde.

3.1.6 Gelelektrophorese

3.1.6.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Überprüfung der Güte und Quantität von PCR-Produkten wurden 6%ige Polyacrylamidgele verwendet. Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) basiert auf der durch Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysierten Polymerisation von Acrylamid, wobei Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalgeber dient. In Tabelle 22 ist der Ansatz für ein Standardgel verzeichnet.

Reagenz	Volumen (μ l)
6% Polyacrylamidlösung/TBE	30ml
10% Ammoniumpersulfat-Lösung	375
TEMED	15
gesamt	30,4ml

Tabelle 22 Standard-PAA-Gelansatz (6%).

Zur Größenbestimmung der Amplifikate diente der pBR322/BsuRI Marker von Fermentas. Die Elektrophorese wurde mit 1x TBE-Puffer als ionischer Pufferlösung durchgeführt. Es wurden standardmäßig 5 μ l PCR-Produkt mit 1 μ l 6x Ladepuffer aufgetragen und mit einer Spannung von 12V/cm² bis etwa 7/8 der Laufstrecke (blaue Bromphenolblaubanden) aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad (2 Liter demineralisiertes Wasser mit 100 μ l EtBr-Stammlösung (10mg/ml) AppliChem, Darmstadt) für 3min angefärbt und mittels eines Geldokumentationssystem mit UV-Transilluminator der Firma Intas fotografiert. Bei der Interkalation des Ethidiumbromids zwischen den DNA-Basen steigt die Fluoreszenz um das 20-fache, wodurch sich die einzelnen Banden im Gel deutlich vom Hintergrund abheben. Die Bandenintensität ist proportional sowohl zur Anzahl der DNA-Moleküle als auch zur Länge des DNA-Strangs.

3.1.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient genau wie die PAGE der Auftrennung und Größenbestimmung von Nukleinsäuren, wobei das feinmaschige Netzwerk des PAA-Gels nur für kleine Nukleinsäurefragmente <500bp anwendbar ist. Für die Kontrolle des Fragmentations- und Degradationsgrades von hochmolekularer genomischer DNA, großen PCR-Produkten sowie Gesamt-RNA wurden daher Agarosegele verwendet. Als Standard-Konzentrationen wurden dabei 1%-Agaroselösungen eingesetzt (Tabelle 23).

Reagenz	Menge
Agarose	0,15g
1xTBE-Puffer	15ml
gesamt	15ml

Tabelle 23 Standard-Agarose-Gelansatz (1%).

Die Agarose wurde 2-3min bei 700W in der Mikrowelle aufgekocht und vollständig gelöst. Nachdem die Lösung bis auf 55°C abgekühlt war, wurde sie in eine Kunststoffkammer mit einem Kamm gegossen und erkalten gelassen. Es wurden pro Geltasche 5µl der jeweiligen Probe mit 1µl 10x Ladepuffer aufgetragen. Als Größenstandard diente ein 100bp Ladder Marker (Fermentas). Das Gel wurde unter Verwendung von 1x TBE-Puffer bei 6V/cm laufen gelassen (Tabelle 24).

Reagenz	Menge
Tris	270g
Borsäure	137g
0,5 M EDTA, pH 8,0	100ml
demineralisiertes Wasser	ad 25l

Tabelle 24 Standard-Ansatz 1x TBE-Puffer.

Nach dem Erreichen von etwa 7/8 der Laufstrecke (blaue Bromphenolblaubanden) wurden die Gele mit Ethidiumbromid in einem Färbebad für 15min gefärbt und mit einem Geldokumentationssystem mit UV-Transilluminator der Firma Intas fotografiert.

3.1.6.3 Denaturierende Agarosegelelektrophorese für RNA

Zur Kontrolle des Degradationsgrades von Gesamt-RNA aus Zelllinien und Kryomaterial wurde ein 0,8% denaturierendes Agarosegel verwendet (Brown et al., 2004).

Reagenz	Menge
di-Natriumtetraborat	24,73g
Borsäure	38,14g
0,5 M EDTA (pH=8,0)	8ml
DEPC (0,2%)	2ml
	ad
demineralisiertes Wasser	1000ml
gesamt	1000ml

Tabelle 25 Standard-Ansatz 20x Borat-Puffer.

Vor Beginn der Elektrophorese mussten zunächst RNA-Probenpuffer (Tabelle 26) und 20x Borat-Puffer (Tabelle 25) angesetzt werden. Der 20x Boratpuffer wurde vor Gebrauch zweimal autoklaviert, um alle Bestandteile vollständig zu lösen.

Reagenz	Volumen (μ l)
99% Formamid	197
37% Formaldehyd	64
20x Borat-Puffer	39
100mg/ml Bromphenolblau 0,2mg/ml	2
100mg/ml Xylencyanol 0,2mg/ml	2
10mg/ml Ethidiumbromid 10 μ g/ml	1
gesamt	300

Tabelle 26 Standard-Ansatz 1,5x RNA-Probenpuffer.

Zum Gießen des 0,8% denaturierenden Agarosegels (Tabelle 27) wurden zunächst nur die Agarose mit 20x Borat-Puffer und Aqua bidest. in der Mikrowelle aufkocht, auf 55°C abkühlen gelassen und darauf hin das Formaldehyd hinzugefügt. Das Gel wurde 30min bei Raumtemperatur zum Aushärten gelagert.

Reagenz	Menge
Agarose	1,2g
20x Borat-Puffer	7,5ml
37% Formalde- hyd	24,8ml
Aqua bidest.	117ml
gesamt	150 ml

Tabelle 27 Standard-Ansatz 0,8% Agarose-Gel.

Zur Probenvorbereitung wurden 20 μ g RNA mit 2 Volumina 1,5xRNA-Probenpuffer für 10min bei 65°C erhitzt und anschließend 5min auf Eis inkubiert. Zur Elektrophorese wurden üblicherweise 2 μ l Proben mit 4 μ l RNA-Probenpuffer auf das 0,8% Agarose-Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente ein 100bp DNA-Ladder Marker (Fermentas). Die Elektrophorese wurde in 1x Borat-Puffer bei 6V/cm durchgeführt, wobei die Bromphenolblau-Bande bis zur Hälfte der Gelstrecke laufen sollte. Abschließend wurden die Gele mit Ethidiumbromid in einem Färbebad für 15min gefärbt und mit einem Geldokumentationssystem mit UV-Transilluminator der Firma Intas fotografiert.

3.1.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) wurden die RACE-Produkte für die weitere Verwendung aus Agarosegelen extrahiert. Hierbei wurde TBE als Laufpuffer verwendet. Mit diesem Verfahren können bis zu 400mg Agarose pro Reaktionsgefäß verarbeitet werden. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei RT in einer Tischzentrifuge bei 13.000rpm (16.100g) durchgeführt.

Die DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell auf dem Transilluminator aus dem Gel geschnitten, wobei der Gelblock so klein wie möglich gehalten wurde. Anschließend wurde der Agaroseblock in einem 2ml *safe lock* Reaktionsgefäß mit bekanntem Gewicht gewogen und 3 Volumina QG-Puffer zu einem Volumen Gel gegeben (w/v). Die Proben sind bei 50°C für 15min im Wasserbad inkubiert worden, bis sich das Gelstück komplett gelöst hatte. Hierzu wurden die Reaktionsgefäße alle 3min gevortext. Nachdem das Gelstück komplett gelöst war, wurde die Qualität des QG-Puffers überprüft. Eine gelbe Färbung zeigte den korrekten pH-Wert ($\text{pH} \leq 7,5$) an. Es wurde 1 Volumen (je nach Größe des Gelstücks) Isopropanol zu der Probe gegeben und durch Vortexen gemischt, um die Ausbeute an DNA-Fragmenten $<500\text{bp}$ und $>4\text{kb}$ zu erhöhen. Zur Extraktion wurde eine QIAquick Spin Säule (maximal 800 μl Probenlösung) in ein 2ml Sammelgefäß gegeben. Um die DNA an die Säule zu binden, wurde die Probe auf die Säule gegeben und 1min bei 13.000rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die QIAquick Spin Säule in das selbe Sammelgefäß eingesetzt. Es wurden nun 0,5ml QG-Puffer auf die Säule gegeben, um etwaige Agarosereste zu entfernen und 1min bei 13.000rpm zentrifugiert. Zum Waschen der Probe wurden 0,75ml PE-Puffer auf die Säule gegeben und 1min bei 13.000rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen und die Säule ein weiteres Mal 1min bei 13.000rpm zentrifugiert, um restlichen Ethanol zu entfernen. Die Säule wurde nun in ein sauberes 1,5ml Reaktionsgefäß eingesetzt. Um die DNA zu eluieren, wurden 25 μl EB-Puffer (10mM Tris-Cl, $\text{pH}=8,5$) auf die Mitte der QIAquick Membran gegeben, 1min stehen gelassen und die Säule für 1min bei 13.000rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, um die DNA-Ausbeute zu maximieren. Zur Kontrolle wurde die DNA auf einem 1%Agarosegel mit TBE-Puffer analysiert. Die DNA wurde für weitere Analysen bei -20°C gelagert.

3.1.8 Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

3.1.8.1 Quantitative Real-Time PCR mit Hydrolysesonden zur Qualitätskontrolle (β -Actin-Test)

Um die Qualität und somit die spätere Verwendbarkeit von Natriumbisulfit-konvertierter DNA (kDNA) zu überprüfen, wurde eine quantitative Real-Time PCR durchgeführt. Hierzu wurde ein kleiner Abschnitt des ACTB-Genes amplifiziert. Der resultierende C_T -Wert diente dabei als Maß für die Güte der kDNA. Das zugrunde liegende Reaktionsprinzip hierbei ist eine quantitative Real-Time PCR mit Hydrolysesonden (Applied Biosystems TaqMan®), bei der eine für das Amplifikat spezifische Sonde, die mit einem Quencher und einem Fluorochrom gekoppelt ist, verwendet wird. Bei dieser PCR wird die Sonde durch die Exonucleaseaktivität der Polymerase hydrolysiert, das Fluorochrom vom Quencher getrennt und proportional zur synthetisierten DNA-Menge Fluoreszenzlicht emittiert. Nachfolgend ist der Reaktionsansatz für diese qRT-PCR aufgelistet (Tabelle 28).

Reagenz	1x (4,5 mM MgCl ₂) Mastermix (μ l)
PCR-Wasser	15,465
10x Platinum Taq-Puffer	2,5
50 mM MgCl ₂	4,5
dNTP's (je 10mM)	0,5
Primermix (10 pmol/ μ l) (ACTB 1M5'/3')	0,6
Platinum Taq Polymerase (5 units/ μ l)	0,125
ROX	0,25
Sonde (ACTB-M)	0,06
kDNA	1
gesamt	25

Tabelle 28 Reaktionsansatz für qRT-PCR (ACTB-Test).

Vor Beginn der Arbeiten wurde eine Plattenbelegung der 96-Well-Platte erstellt. Der qRT-PCR-Mastermix wurde zunächst laut Tabelle 28 ohne kDNA für alle Reaktionen (Anzahl der Proben= n+10% Überschuss) in einem 2ml Reaktionsgefäß im PCR-Vorbereitungsraum hergestellt. Im Prä-PCR-Labor wurde die DNA in eine 0,1ml 96-

Well-Platte von Applied Biosystems vorgelegt, je Probe 24µl Mastermix hinzugegeben und die Platte mit einem optischen Film verschlossen. Unmittelbar vor dem Start der qRT-PCR wurde die 96-Well-Platte kurz abzentrifugiert (1min bei 2600rpm (1000g)). Alle qRT-PCR's sind mit einem Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System in einem weiteren separaten Raum durchgeführt worden. Das qRT-PCR-Programm ist in Tabelle 29 dargestellt.

Temperatur	Zeit	
95°C	20sec	
95°C	3sec	} 40 Zyklen
60°C	30sec	
8°C	Pause	

Tabelle 29 PCR-Programm der qRT-PCR.

Anschließend wurden die Fluoreszenzsignale ausgewertet und der C_T -Wert bei $\frac{1}{3}$ der exponentiellen Teilstrecke der Kurve (halblogarithmische Darstellung) gesetzt. Das PCR-Produkt wurde bei -20°C gelagert.

3.1.8.2 Quantitative Real Time-MSP mit SYBR Green (Methylight-PCR)

Die quantitative Real Time-MSP wurde mit dem Fluorochrom SYBR Green als semi-quantifizierbare Alternative zur rein qualitativen MSP durchgeführt (Eads et al., 2000). SYBR Green bindet, ähnlich der Interkalation von Ethidiumbromid, unspezifisch an doppelsträngige DNA. Der DNA-Farbstoffkomplex fluoresziert bei der Wellenlänge $\lambda=521\text{nm}$ mit einer zur gebildeten PCR-Produktmenge proportionalen Intensität, was eine Quantifizierung des PCR-Produktes während der Reaktion ermöglicht. Für die Amplifikation der Kandidaten-microRNAs wurden methylierungsspezifische Primer eingesetzt. Als interne Kontrolle wurde das ACTB-Gen mit methylierungsinsensitiven Primern amplifiziert, da nicht dessen Methylierung, sondern nur die absolute Menge an DNA gemessen werden sollte. Die ACTB-Amplifikation wurde durchgeführt, um die eingesetzte kDNA-Menge zu normalisieren, indem die ΔC_T -Werte von microRNA- und ACTB-PCR-Produkt berechnet wurden. In den folgenden Tabellen sind die Reaktionsansätze (Tabelle 30) und das qRT-MSP Programm (Tabelle 31) dieses Assays dargestellt.

Reagenz	1x (4,5 mM MgCl ₂) Mastermix (µl)
PCR-Wasser	16,4
10x Platinum Taq-Puffer	2,5
50 mM MgCl ₂	1,5
dNTP's (je 10mM)	0,5
Primermix (10 pmol/µl) (ACTB 1M5'/3')	0,6
Platinum Taq Polymerase (5 units/µl)	0,125
ROX	0,25
SYBR Green (1x)	2
kDNA	1
gesamt	25

Tabelle 30 Reaktionsansatz für die qRT-MSP mit SYBR Green.

Zunächst wurde eine Plattenbelegung der 96-Well-Platte erstellt. Der qRT-MSP-Mastermix wurde zunächst laut Tabelle 30 ohne kDNA für alle Reaktionen (Anzahl der Proben = n+10% Überschuss) in einem 2ml Reaktionsgefäß im PCR-Vorbereitungsraum hergestellt. Im Prä-PCR-Labor wurde die DNA in eine 0,1ml 96-Well-Platte von Applied Biosystems vorgelegt, je Probe 24µl Mastermix hinzugegeben und die Platte mit einem optischen Film verschlossen. Unmittelbar vor dem Start der qRT-MSP wurde die 96-Well-Platte kurz abzentrifugiert (1min bei 2600rpm (1000g)). Alle qRT-MSP's sind mit einem Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System in einem weiteren separaten Raum durchgeführt worden. Das qRT-MSP-Programm ist in Tabelle 31 dargestellt.

Temperatur	Zeit	
95°C	5min	
95°C	30sec	} 40 Zyklen
65°C	60sec	
Dissociation Stage		
95°C	15sec	
60°C	60sec	
95°C	15sec	
8°C	Pause	

Tabelle 31 PCR-Programm der qRT-MSP.

Für die Primerpaare MIR-34-MD/MR und ACTB-1M5'/1M3' gelten die gleichen Reaktionsbedingungen. Zur Kalibrierung wurde eine Mischreihe von 100% methylierter DNA (M-DNA) und 0% methylierter DNA (U-DNA) angesetzt und gemessen. Die einzelnen Methylierungswerte sind Tabelle 32 zu entnehmen.

Kalibrationskurve
U/M-DNA 0% M
U/M-DNA 12,5% M
U/M-DNA 25% M
U/M-DNA 37,5% M
U/M-DNA 50% M
U/M-DNA 62,5% M
U/M-DNA 75% M
U/M-DNA 87,5% M
U/M-DNA 100% M

Tabelle 32 Methylierungswerte der jeweiligen Mischverhältnisse von U- und M-DNA.

Im Anschluss wurden die Fluoreszenzsignale ausgewertet und der C_T -Wert bei $\frac{1}{3}$ der exponentiellen Teilstrecke der Kurve (halblogarithmische Darstellung) gesetzt. Die einzelnen U/M-DNA-Mischungen sind in Doppelbestimmungen gemessen und anhand der ΔC_T -Werte die Schwellenwerte für den jeweiligen Methylierungsgrad definiert worden. Das PCR-Produkt wurde bei -20°C gelagert.

3.1.8.3 Quantitative Real-Time PCR mit TaqMan® MicroRNA Assays

Die TaqMan® MicroRNA Assays wurden zur Detektion und Quantifizierung der Expression von murenen microRNAs verwendet. Hierzu ist mit einem separaten Protokoll produktspezifische cDNA hergestellt worden, die dann in der qRT-PCR amplifiziert wurde. Analog mit den Herstellervorgaben wurde die zur cDNA-Synthese verwendete Gesamt-RNA mit der *TRIzol*®-Methode extrahiert. Für die reverse Transkription wurden zunächst die in Tabelle 33 aufgelisteten Reagenzien in 0,2ml Reaktionsgefäße auf Eis zusammengegeben.

Reagenz	Volumen (μl)
100mM dNTPs (mit dTTP)	0,15
MultiScribe™ Reverse Transkriptase, 50 U/ μL	1
10X RT Buffer	1,5
RNase-Inhibitor (20 U/ μl)	0,188
Nukleasefreies Wasser	4,162
5X TaqMan® MicroRNA RT-Primer	3
Gesamt-RNA (1 μg)	5
gesamt	15

Tabelle 33 Reaktionsansatz der TaqMan®-microRNA-cDNA-Synthese.

Je nach Anzahl der Proben wurden n+10% Reaktionen vorbereitet, um Pipettierverluste zu kompensieren. Es musste je Probe eine individuelle cDNA hergestellt werden. Die Reaktionsbedingungen der reversen Transkription sind in Tabelle 34 aufgeführt.

Zeit (min)	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)
30	16
30	42
5	85
∞	4

Tabelle 34 Programm TaqMan®-microRNA-cDNA-Synthese.

Sämtliche cDNA-Synthesen sind mit einem Biometra T-Personal-Cycler durchgeführt worden. Nach Abschluss der Reaktion wurde die neu synthetisierte cDNA sofort als Template in der qRT-PCR eingesetzt. Die restliche cDNA wurde bei -20°C gelagert. Für die qRT-PCR-Reaktion sind anschließend folgende Reagenzien (Tabelle 35) in einer Applied Biosystems-96-Well Platte auf Eis vorbereitet und kurz abzentrifugiert (1min bei 2600rpm (1000g)) worden.

Die Reaktionsbedingungen der Real-Time PCR sind in Tabelle 36 aufgeführt. Alle qRT-PCR's sind mit einem Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Run mode: 9600 Emulation) in einem weiteren separaten Raum durchgeführt worden. Nach Abschluss der TaqMan® microRNA Real-Time PCR wurden die Fluoreszenzsignale ausgewertet und der C_T -Wert bei $\frac{1}{3}$ der exponentiellen Teilstrecke der Kurve (halblogarithmische Darstellung) gesetzt.

Reagenz	Volumen/20µL Reaktion
TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix (No AmpErase® UNG)	10
Nukleasefreies Wasser	7,67
TaqMan® MicroRNA Assays 20X TaqMan® Assay	1
RT Product (1:15 Verdünnung der RT-Reaktion)	1,33
gesamt	20

Tabelle 35 Reaktionsansatz der TaqMan® microRNA qRT-PCR.

Die in der qRT-PCR ermittelten C_T -Werte für die mature microRNA und interne Referenzgene (RNU24, U54 und Z30) einer Probe wurden für die Berechnung des $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Wertes zur Bestimmung der relativen Expression der microRNA einer Probe in Bezug auf eine separate Kontrollprobe verwendet (Livak and Schmittgen, 2001). Die somit normalisierten Daten lassen Aussagen über die Expressionsverhältnisse eines Genes in verschiedenen Proben zu. Das PCR-Produkt wurde bei -20°C gelagert.

Temperatur	Zeit	
95°C	10min	
95°C	15sec	} 40 Zyklen
60°C	60sec	
8°C	Pause	

Tabelle 36 PCR-Programm der TaqMan®-microRNA-qRT-PCR.

3.1.9 Primärtranskript- und Promotoranalysen

3.1.9.1 Nested-PCR zur Identifizierung von microRNA-Primärtranskripten

Nachdem *in silico* putative Primärtranskripte bestimmter microRNAs (pri-microRNA) ermittelt wurden, sollten diese experimentell mit einer cDNA-Nested-PCR validiert werden. Hierzu wurde zunächst Gesamt-cDNA (siehe Kapitel 3.1.3) synthetisiert, die dann als Template für die Nested-PCR dienen sollte.

Bei der Nested-PCR werden zwei Primerpaare zur Amplifikation eines gewünschten DNA-Abschnittes verwendet, die zueinander geschachtelt liegen, das heißt, das erste Transkript (1n) ist größer als das zweite Transkript (2n), dessen Primer auf der Sequenz von 1n binden. Der Standard-Ansatz für eine Nested-PCR mit 25µl ist in Tabelle 37 beschrieben.

Reagenz	1x (1,5 mM MgCl ₂) Mastermix (µl)	1x (2,5 mM MgCl ₂) Mastermix (µl)
PCR-Wasser	18,4	17,4
10x Platinum Taq-Puffer	2,5	2,5
50mM MgCl ₂	1,5	2,5
dNTP's (je 10mM)	0,5	0,5
Primermix (1n/2n) (10pmol/µl)	1	1
Platinum Taq Polymerase (5 units/µl)	0,1	0,1
cDNA aus Gesamt-RNA (1n)/ 1n-PCR-Produkt (2n)	1	1
gesamt	25	25

Tabelle 37 Reaktionsansatz für Nested-PCR (cDNA).

Der Nested-PCR-Mastermix wurde zunächst laut Tabelle 37 ohne cDNA für alle Reaktionen (Anzahl der Proben = n+10% Überschuss) in einem 2ml Reaktionsgefäß hergestellt. In einem separaten Raum ist darauf hin die DNA in die 0,2ml PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt worden. Unmittelbar vor dem Start der Nested-PCR wurden je Probe 24µl Mastermix hinzugegeben, durch Anschnipsen gemischt und die Reaktionsgefäße kurz abzentrifugiert (10sec bei 13.000rpm). Alle Nested-PCR 's sind mit einem Biometra T1 Thermocycler in einem weiteren separaten Raum durchgeführt worden. Das Nested-PCR-Programm ist in Tabelle 38 dargestellt.

Temperatur	Zeit
95°C	5min
95°C	30sec
60°C	45sec
72°C	45sec
72°C	10,min
8°C	Pause

} 40 Zyklen

Tabelle 38 PCR-Programm der Nested-PCR.

Nach Abschluss der Reaktion wurden 5µl des Nested-PCR -Produktes auf einem 6% Polyacrylamidgel analysiert und für den sofortigen Gebrauch bei 4°C aufbewahrt. Unabhängig davon, ob ein PCR-Produkt der Amplifikation von 1n auf dem Gel zu erkennen war, wurde 1µl des 1n PCR-Produktes als Template für die 2n-PCR eingesetzt. Der Reaktionsansatz entsprach dem von 1n, bis auf die Primer (2n) und das 1n-PCR-Produkt als Template anstelle der cDNA (Tabelle 37). Das PCR-Programm ist gleichermaßen übernommen worden, wobei nur die Annealing-Temperatur dem 2n-Primerpaar angepasst wurde. Das 2n- PCR-Produkt wurde ebenfalls auf einem 6% Polyacrylamidgel analysiert und für die mittelfristige Lagerung (4-6 Wochen) bei -20°C eingefroren.

3.1.9.2 Modifiziertes 5'-RACE Protokoll für GC-reiche microRNAs

Die 5'-RACE (*Random Amplification of cDNA Ends*) (Frohman, 1993) ist eine Methode zur Identifizierung von Primärtranskripten von RNA-Molekülen. Anhand der Elongation eines cDNA-Produktes in 5'-Richtung mit einem Primer, der an eine bekannte, transkribierte Region bindet, kann das 5'-Ende eines Primärtranskripts einer mRNA oder einer Pri-microRNA ermittelt werden.

Zur Vermeidung von Komplikationen bei der Durchführung einer 5'-RACE durch die Bildung von Sekundärstrukturen aufgrund von repetitiven Sequenzen der Ziel-RNA wurde das Protokoll entsprechend der unten aufgeführten Schritte durchgeführt, da die untersuchte microRNA in einer GC-reichen Regionen liegt.

Alle cDNA-Synthese-Reaktionen sind mit einem Biometra T-Personal Thermocycler, die PCR-Reaktionen hingegen mit einem Biometra T1 Thermocycler in einem separaten Raum durchgeführt worden.

Die folgenden Arbeiten wurden auf RNase-freien Flächen und auf Eis durchgeführt. Zur Vorbereitung der RNA mussten die RNA-Aliquots aus dem -80°C Schrank vor der Verwendung erst in DEPC-Wasser aufgenommen werden. Hierzu wurden alle Proben 30min bei 13.000rpm (16.100 g) und 4°C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das RNA-Pellet wurde mit 500µl 70% Ethanol gevortext und 5min bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das RNA-Pellet 5min bei RT trocknen gelassen. Anschließend ist das RNA-Pellet je nach Größe in mindestens 50µl DEPC-Wasser gelöst und die Absorption bei $\lambda=260\text{nm}$ zur Konzentrationsbestimmung gemessen worden.

Zur Synthese des cDNA-Erststranges wurden die unten beschriebenen Reagenzien für einen 50µl Ansatz zusammengegeben und vor Gebrauch gründlich durch Vortexen gemischt. In einem 0,2ml Reaktionsgefäß wurden 5µg Gesamt-RNA mit DEPC-Wasser auf 20µl aufgefüllt und 5µl der 1µM GSP1-Lösung zusammengegeben, durch Anschnipsen gemischt und 30sec bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert. Danach sind die Proben für 10min bei 70°C und anschließend bei 50°C inkubiert worden, bis der nächste Reaktionsschritt gestartet wurde. In einem separaten Reaktionsgefäß wurde das folgende Reagenziengemisch zusammengegeben (Tabelle 39). Es wurden n+10% Überschuss Reaktionen angesetzt.

Reagenz	Volumen (µl)
DEPC-Wasser	6,5
10X PCR-Puffer	5
25mM MgCl ₂	5
10mM dNTP's	2,5
0.1 M DTT	5
Super Script II RT (200 Units)	1
gesamt	25

Tabelle 39 Reaktionsansatz cDNA-Synthese 5'-RACE.

Vor Gebrauch wurde der Mastermix auf 50°C erwärmt. Zum RNA/Primergemisch wurden 25µl des vorgewärmten Reaktionsgemisches gegeben, durch Anschnipsen gemischt und bei 50°C für 50min inkubiert. Die Reverse Transkriptase wurde für 15min bei 70°C inaktiviert, die Proben auf Eis gekühlt und 30sec bei 13.000rpm zentrifugiert. Zu jeder Reaktion wurde 1µl RNase-Mix gegeben. Die Proben wurden darauf hin 30min bei 37°C inkubiert und dann auf Eis gelagert.

Reagenz	Volumen
cDNA	26µl
LPA	1µl
1/10 Volumen Na-Acetat (pH=7,0; +100µg/mL Dextran)	2,7µl
2½ Volumina 100% Ethanol	67,5µl
gesamt	97,2µl

Tabelle 40 Reaktionsansatz cDNA-Aufreinigung mit LPA für 5'-RACE.

Für die Aufreinigung der cDNA mit linearem Polyacrylamid (LPA) wurde zunächst die LPA-Stammlösung 1:5 mit DEPC Wasser verdünnt. In einem 1,5ml Reaktionsgefäß wurden die in Tabelle 40 aufgeführten Reagenzien vorgelegt.

Die DNA ist darauf hin über Nacht bei -20°C gefällt, am nächsten Tag für 20min bei 4°C und 13.000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen worden. Das Pellet wurde mit 500µl 70% Ethanol gevortext, 5min bei 4°C und 13.000rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet kurz an der Luft trocknen gelassen. Anschließend wurde das Pellet in 20µl Aqua bidest. gelöst und bei -20°C gelagert.

Reagenz	Volumen (µl)
DEPC-Wasser	6,5
5X Tailing-Puffer	5
2mM dCTP	2,5
LPA-aufgereinigte cDNA	10
gesamt	24.0

Tabelle 41 dC-Markierung der aufgereinigten cDNA für 5'-RACE.

Zur Bindung des universalen Oligo-G RACE-Primers musste die cDNA oligo-dC-markiert werden. Hierzu wurden in einem 0,2ml Reaktionsgefäß die folgenden Reagenzien (Tabelle 41) vorgelegt und durch Ansnipsen gemischt.

Reagenz	Volumen (µl)
PCR-Wasser	31,5
10x Platinum Taq-Puffer	5
25mM MgCl ₂	3
10mM dNTP's	1
nested GSP2 (10µM Lösung)	2
Abridged Anchor Primer (10 µM)	2
dC-tailed cDNA	5
Platinum Taq Polymerase (5 units/µl)	0,5
gesamt	50

Tabelle 42 Reaktionsansatz GSP2-PCR für 5'-RACE.

Die Reaktion wurde 3min bei 94°C, danach 1min bei 4°C inkubiert und 30 sec bei 13.000rpm zentrifugiert und auf Eis gelagert. Es wurde 1µl TdT hinzugegeben, durch Ansnipsen gemischt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Terminale Transferase

wurde für 10min bei 65°C inaktiviert, der Ansatz 30sec bei 13.000rpm zentrifugiert und auf Eis gelagert.

Im Anschluss wurde die cDNA mit dC-Tail in einer Hot Start-PCR amplifiziert, bei der der Heizblock des Thermocyclers auf 94°C vorgeheizt wurde. Die in Tabelle 42 aufgeführten Reagenzien wurden in ein 0,2ml Reaktionsgefäß auf Eis gegeben.

Die Reaktionsgefäße wurden direkt vom Eis in den 94°C Thermocycler gestellt. Das PCR-Protokoll ist in Tabelle 43 aufgeführt.

Temperatur	Zeit	
94°C	1min	
94°C	1min	} 35 Zyklen
55°C	1min	
72°C	2min	
72°C	7min	
5°C	Pause	

Tabelle 43 PCR-Programm der GSP2-PCR.

Zur Überprüfung der bisherigen RACE-Effizienz wurden 5µl des 5'-RACE-Produktes auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt.

Reagenz	Volumen (µl)
PCR-Wasser	31,5
10x Platinum Taq-Puffer	5
25mM MgCl ₂	3
10mM dNTP's	1
nested GSP3 (10µM Lösung)	2
Abridged Universal Anchor Primer (10 µM)	2
1:100 verdünntes GSP2-PCR-Produkt	5
Platinum Taq Polymerase (5 units/µl)	0,5
gesamt	50

Tabelle 44 Reaktionsansatz GSP3-PCR für 5'-RACE.

Abschließend wurde die RACE-DNA in einer Nested-PCR weiter amplifiziert, um auch geringe Templatemengen für folgende Klonierungs- und Sequenzierungsschritte nutzbar zu machen. Dementsprechend wurde eine Verdünnung (1:100) der ersten PCR als

Template für die zweite, Nested-PCR verwendet. Hierzu ist ein 5µl Aliquot der ersten PCR in 495µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, (pH 8.0), 1 mM EDTA) verdünnt worden. Der Heizblock des Thermocyclers wurde auf 94°C vorgeheizt. Auf Eis wurde nun der folgende Reaktionsansatz in einem 0,2ml Reaktionsgefäß vorgelegt (Tabelle 44).

Die Reagenzien wurden durch Anschnipsen gemischt und die PCR-Reaktion nach folgendem Schema gestartet: Die Reaktionsgefäße wurden direkt vom Eis in den 94°C Thermocycler gestellt. Das PCR-Protokoll ist in Tabelle 43 aufgeführt, wobei die Annealing-Temperatur der Primer gegebenenfalls angepasst wurde.

Nach 35 Zyklen PCR wurden 5µl PCR-Produkt auf einem 1%-Agarosegel aufgetrennt und weiter für das TOPO-Cloning bei -20°C gelagert.

3.1.10 Klonierung der RACE-Produkte in chemisch kompetente *E.coli*

Alle Klonierungsarbeiten wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt (§7 GenTG). Zur Ligation und Transformation von chemisch kompetenten *E.coli* TOP10 Zellen wurde das TOPO TA Cloning Kit for Sequencing verwendet. Alle Arbeiten mit S1-Organismen erfolgten im semisterilen Bereich neben einer Bunsenbrennerflamme. Um die RACE-Produkte sequenzieren zu können, mussten diese zunächst mit Hilfe von Plasmiden amplifiziert werden, die zuvor in Bakterien transformiert worden sind.

3.1.10.1 Vorbereitungen für die Klonierung

Zur Kultur der TOP10-Zellen wurde LB-Medium (Luria Bertani Medium) genutzt (Sambrook J., 1989), das zur Herstellung von LB-Amp-Medium und LB-Amp-Agarplatten verwendet wurde. Die Zusammensetzung der Medien ist in Tabelle 45 erläutert.

Der pH-Wert ist mit 5N NaOH-Lösung auf pH=7 eingestellt worden. Anschließend wurde das Medium mit demineralisiertem Wasser auf 1000ml aufgefüllt. Zum Gießen der Agarplatten wurden 15g Agar hinzugefügt. Das Medium wurde autoklaviert (121 °C für 20min bei 1,1 Bar Überdruck) und auf 50°C abkühlen gelassen. Als selektierendes Antibiotikum wurden 1000µl Ampicillin (50mg/ml) je 1000ml Medium hinzugegeben. Der LB-Agar wurde in 100mm Petrischalen gegossen und in Stapeln zu 20 Schalen

erkalten gelassen. Anschließend sind beide Medien bei 4 °C im Kühlraum gelagert worden.

Reagenz	Menge
Trypton	10g
Hefeextrakt	5g
NaCl	10g
Demineralisiertes Wasser	950ml
gesamt	1000ml

Tabelle 45 Ansatz LB-Medium.

3.1.10.2 Hitzeschock-Transformation von chemisch kompetenten TOP10

Vor Beginn der Arbeiten sind die LB-Amp Platten im Labor auf Raumtemperatur equilibriert worden. Die chemisch kompetenten *E.coli* TOP10 Zellen (50µl Aliquots) wurden langsam auf Eis auftauen gelassen. In einem 1,5ml Reaktionsgefäß wurde der folgende Ansatz (Tabelle 46) auf Eis präpariert, um die Bakterien chemisch für die Aufnahme der negativ geladenen DNA vorzubereiten.

Reagenz	Volumen (µl)
PCR Produkt	3
Salt Solution (NaCl/MgCl)	1
steriles Aqua bidest.	1
TOPO Vektor	0,5
gesamt	5,5

Tabelle 46 Reaktionsansatz Hitzeschocktransformation.

Der Ansatz ist durch Anschnipsen gemischt und 30min bei Raumtemperatur inkubiert worden. Zu dem kompletten Ligationsansatz (5,5µl) wurden 50µl kompetente *E.coli* Zellen hinzugefügt, wobei die Zellen vorsichtig mit einer 100µl-Pipette hinzugegeben wurden, um die Bakterien nicht zu beschädigen. Der gesamte Ansatz wurde nun vorsichtig durch Anschnipsen gemischt und für 30min auf Eis inkubiert. Zur Permeabilisierung der bakteriellen Zellmembran, bei der die Plasmide aufgenommen werden kön-

nen, wurden die Reaktionsgefäße für 30sec bei 42°C im Wasserbad einem Hitzeschock unterzogen und unmittelbar danach auf Eis gestellt. Es wurde 300µl SOC-Medium hinzugefügt und die Bakterien eine Stunde bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend ist der komplette Ansatz auf je drei auf RT temperierten LB-Amp Platten ausplattiert und bei 37°C im Brutschrank über Nacht inkubiert worden.

Am nächsten Tag wurden die Platten, auf denen Kolonien gewachsen waren, mit Parafilm verschlossen und für fünf Stunden bei 4°C gelagert, um das weitere Wachstum der Bakterien zu inhibieren. Am Nachmittag wurden die Kolonien für Übernachtskulturen gepickt.

3.1.10.3 *E.coli* TOP10 Übernachtskulturen

Die Kulturen sind in 15ml Röhrchen mit Schraubdeckelverschluss angesetzt worden. Je Röhrchen wurde eine einzelne Kolonie mit einer sterilen weißen Pipettenspitze gepickt und in 5ml LB-Amp-Medium resuspendiert. Parallel dazu wurde dieselbe Spitze auf einer LB-Amp-Platte ausgestrichen, um eine Dauerkultur des Klons hochzuziehen. Beide Kulturen wurden über Nacht bei 37°C und 200rpm inkubiert. Die LB-Amp Platte ist am nächsten Tag auf Wachstum überprüft und für 4-6 Wochen bei 4°C gelagert worden. Die flüssige Übernachtskultur wurde nach der Inkubation über Nacht für eine Plasmidpräparation mit anschließender M13-Test PCR eingesetzt.

3.1.10.4 Plasmidpräparation der TOPO-Vektoren

Zur Präparation der Plasmide aus der LB-Amp Übernachtskultur wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit verwendet. Mit diesem Kit können bis zu 20µg High-copy Plasmid-DNA aus bis zu 5ml *E.coli* Übernachtskultur in LB-Medium gewonnen werden. Dieses Kit bedient sich der modifizierten alkalischen Lysis-Methode von Birnboim et Doly (Birnboim and Doly, 1979). Die Bakterien werden hierbei unter alkalischen Bedingungen lysiert und das entstandene Lysat in einem Schritt neutralisiert und an salzreiche Bindebedingungen angepasst. Nach der Bereinigung des Lysates kann die Probe über eine Silica-Membran-Säule aufgereinigt werden. Alle Schritte dieses Protokolls werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Es sind zunächst 2ml Übernachtskultur für 30 sec. bei 13.000 rpm (16.100g) und Raumtemperatur abzentrifugiert und der Überstand ver-

worfen worden. Das bakterielle Pellet wurde in 250µl P1-Puffer (mit RNase A) rückstandslos durch Pipettieren resuspendiert und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß transferriert. Darauf hin wurden 250µl P2-Puffer hinzugegeben und durch sechsmaliges Invertieren gemischt, bis das Lysat viskos und klar wurde. Dies geschah, um Scherkräfte, die die bakterielle genomische DNA brechen lassen könnten, zu vermeiden. Es wurden 350µl N3-Puffer zur Präzipitation von Proteinen und SDS hinzugegeben und sofort durch sechsmaliges Invertieren gemischt, bis sich ein schleierartiges Präzipitat bildete.

Die Proben sind für 10min bei 13.000rpm zentrifugiert worden, wobei sich ein kompaktes, weißes Pellet bildete. Die Überstände wurden durch Dekantieren auf die QIAprep Spin-Säule gegeben, 1min bei 13.000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurde die Säule mit 500µl PB-Puffer gewaschen, 1min bei 13.000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen, um etwaige Reste von Nukleaseaktivitäten der Bakterien zu entfernen. Die QIAprep Spin-Säule wurde mit 750µl PE-Puffer gewaschen und 1min bei 13.000rpm zentrifugiert. Der Überstand ist verworfen und die Probe nochmals 1min bei 13.000rpm zentrifugiert worden, um sämtlichen verbleibenden Waschpuffer zu entfernen. Die QIAprep Spin-Säule wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß eingesetzt. Um die DNA zu eluieren, wurden 25µl EB-Puffer (10mM TrisCl, pH=8,5) auf die Mitte jeder Membran gegeben, die Säule 1min stehen gelassen und 1 min bei 13.000rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, um die Ausbeute an Plasmid-DNA zu maximieren. Abschließend ist die Absorption der Plasmid-DNA am Spektralphotometer ($\lambda=260\text{nm}$) zur Konzentrationsbestimmung gemessen worden. Die Plasmide wurden entweder bis zur Sequenzierung oder für die M13-PCR bei -20°C gelagert.

3.1.11 DNA-Sequenzierung der TOPO-Vektoren mit RACE-Produkt-Insert

Reagenz	Volumen (µl)
Primer M13r (20pmol/µl)	1
pCR4TOPO mit Insert in Tris/Cl (pH=8,5)	6
gesamt	7

Tabelle 47 Reaktionsansatz Sequenziervorbereitung.

Die Sequenzierarbeiten wurden von der Firma SeqLab, Göttingen, Deutschland durchgeführt. Hierzu wurden in ein 0,2ml Reaktionsgefäß mit flachem Deckel die folgenden

Reagenzien (Tabelle 47) gegeben und in einem 50ml Schraubdeckelröhrchen verschickt.

3.2 Bioinformatische Methoden

3.2.1 *In silico* Sequenzanalysen

3.2.1.1 Untersuchung der microRNA-Kandidaten auf konservierte Sequenzabschnitte, putative Promotorregionen und CpG-Insel-Assoziation

3.2.1.1.1 Promotorvorhersage mit *WWW Promoter Scan*

Der Algorithmus von *WWW Promoter Scan* Version 1.7 sucht auf beiden Strängen eines ausgewählten DNA-Bereiches nach putativen eukaryotischen DNA-Polymerase II Promotorsequenzen. Die Ergebnisse zeigen die Loci von vorhergesagten Promotorsequenzen, die eine signifikante Anzahl an transkriptionellen Elementen (TE's) enthalten. Diese promotorassoziierten TE's wurden zuvor experimentell ermittelt (Prestridge, 1995). Wenn das Ergebnis einen Schwellenwert überschritten hatte, mit dem 70% aller Primatenpromotoren in der Eukaryotic Promoter Database (Bucher and Trifonov, 1986) entdeckt wurden, konnte ein putativer Promotor bei einer Falsch-Positiv-Quote von 1:14.000 Einzelstrangbasen ermittelt werden. Wenn *WWW Promoter Scan* eine putative Promotorsequenz entdeckt hatte, sucht es als nächstes nach einer TATA-Box und bestimmt dann den Ort des Startpunktes der Transkription (TSS).

Ferner wird den gefundenen TE's ein bestimmter Score zugeordnet, der den Faktor beschreibt, mit dem ein bestimmtes TE häufiger in Promotorsequenzen als in nicht-Promotorsequenzen auftaucht, die jedoch nichts über die Wahrscheinlichkeit der Vorhersage des Promotors aussagt. Ein Score von 50 bedeutet, dass das Signal nur in Promotorsequenzen vorkommt, wobei auch Mehrfachnennungen mit unterschiedlichen Scores auftauchen können.

Zur Untersuchung eines DNA-Abschnittes wurde die *WWW Promoter Scan* Website (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/index.html>) aufgerufen und die entspre-

chende DNA-Sequenz im FASTA-Format in das Eingabefeld eingefügt. Sowohl der (+) als auch der (-)-Strang der Sequenz sind untersucht worden. Die Resultate wurden auf einer neuen Seite dargestellt, nachdem die zu untersuchende Sequenz abgeschickt wurde.

3.2.1.1.2 Promotorvorhersage nach Fujita et al.

Die von Fujita et Iba ermittelten, putativen Promotoren sind in unsere Analysen mit einbezogen worden. In dieser Studie wurden hoch konservierte Bereiche in der Nähe von microRNAs nach Kernpromotor-Elementen durchsucht und die Daten experimentell mit Primer extensions und Northern Blots validiert. Schließlich wurden diese Daten in der Publikation tabellarisch aufgeführt (Fujita and Iba, 2008).

3.2.1.1.3 CpG-Insel-Vorhersage mit *CpG-Island Searcher* und *CpGplot*

Die beiden Programme *CpG-Island Searcher* und *CpGplot* bedienen sich unterschiedlicher Algorithmen, um CpG-Inseln auf bestimmten DNA-Abschnitten vorherzusagen. Die Website von *CpG-Island Searcher* (<http://cpgislands.usc.edu/>) verwendet die Kriterien von Gardiner-Garden und Frommer (Gardiner-Garden and Frommer, 1987), die von Takai und Jones (Takai and Jones, 2002) modifiziert wurden. Ab einem GC-Gehalt von 55%, einem Verhältnis von beobachteten zu erwarteten CpG-Dinukleotiden von 0,65, einer Länge von 500bp und einem Abstand von mindestens 100bp zwischen zwei Inseln, liegt laut Definition eine CpG-Insel vor. Diese Kriterien können auf der Eingabe-seite jedoch verändert werden, um eine höhere bzw. geringere Stringenz bei der Vorhersage zu wählen.

Nachdem die zu untersuchende Sequenz im FASTA-Format in das Eingabefeld eingefügt und die Kriterien bestimmt wurden, konnten die Ergebnisse auf einer neuen Seite betrachtet werden. Die DNA-Sequenz ist als schwarze, horizontale Linie dargestellt worden, die CpG-Dinukleotide als rote, vertikalen Linien und die putativen CpG-Inseln als blaue, horizontale Balken.

Anders als *CpG-Island Searcher*, verwendet *CpGplot* (Larsen et al., 1992) die Standardkriterien von Gardiner-Garden und Frommer (GC-Gehalt ab 50%, einem Verhältnis von beobachteten zu erwarteten CpG-Dinukleotiden ab 0,6 und einer Länge der Sequenz ab 200bp) als Voreinstellung, die jedoch geändert werden kann.

Auf der Website von *CpGplot* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/CpGplot/index.html>) wurde eine Sequenz im FASTA-Format eingefügt oder aus einer kompatiblen Datei hochgeladen. Anschließend konnten die Kriterien zur Stringenzbestimmung gegebenenfalls verändert werden. Nachdem die Sequenz abgeschickt wurde, öffnete sich ein neues Fenster mit den Resultaten. In dem dreigeteilten grafischen Output sind die Kurven für das Verhältnis von beobachteten zu erwarteten CpG-Dinukleotiden, der GC-Gehalt und die CpG-Inseln (als schwarz umrandete Box) über die gesamte Länge der Sequenz dargestellt worden.

Anhand der Vorhersagen beider Programme konnten Rückschlüsse auf CpG-Insel assoziierte microRNAs getroffen werden. Zur eigentlichen Auswahl der Kandidaten-microRNAs wurden jedoch nur die in *CpG-Island Searcher* implementierten Vorgabekriterien von Takai und Jones verwendet, da diese eine höhere Stringenz als die von Gardiner-Garden und Frommer aufwiesen.

3.2.1.1.4 Sequenzanalyse mit dem *UCSC Genome Browser*

Der von der *University of California Santa Cruz* entwickelte *Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>) ermöglicht eine Vielzahl an Sequenzanalysemöglichkeiten, die ständig erweitert wird (Kent et al., 2002) und (Rhead et al., 2010). In dieser Arbeit sind vor allem die in den *Genome Browser* implementierten Regulationsoptionen *CpG-Islands* und *FirstEF: First-Exon and Promoter Prediction* sowie die Konservierungsoption *Vertebrate Multiz Alignment & Conservation (17 Species)* verwendet worden.

Die Option *CpG Islands* bedient sich teilweise der Kriterien von Gardiner-Garden und Frommer, das heißt CpG-Inseln werden gesucht, indem eine Sequenz Base für Base abgesucht wird und ein Score von +17 für CpG-Dinukleotide und -1 für alle anderen Dinukleotide vergeben wird. Somit wurden Segmente mit maximalem Score ermittelt, die dann nach den Kriterien GC-Gehalt $\geq 50\%$, Länge $> 200\text{bp}$ und Verhältnis von beobachteten zu erwarteten CpG-Dinukleotiden $> 0,6$ evaluiert und ggf. als CpG-Insel markiert wurden.

FirstEF: First-Exon and Promoter Prediction (Davuluri et al., 2001) ist ein 5'-terminales Exon- und Promotor-Vorhersage-Programm, das aus verschiedenen Funktionen besteht, die zur Vorhersage von Promotoren, Exons und CpG-Inseln dienen. Das Wahrscheinlichkeitsmodell sucht zunächst nach CpG-abhängigen und CpG-unabhängigen Promotoren sowie potentielle erste *donor sites* (Ende eines Exons/Anfang eines Introns). Für jede potentielle erste *donor site* (Sequenz: 5'-GT-3') und eine dazu in 5'-

Richtung gelegene Promotorregion errechnet FirstEF, ob die dazwischen liegende Sequenz ein potentiell Exon sein könnte. Danach wird in einem 5'-Bereich von 570bp die Wahrscheinlichkeit für einen Promotor, ein Exon und eine *donor site* errechnet.

Mit der Funktion *Vertebrate Multiz Alignment & Conservation (17 Species)* kann die Konservierung von Sequenzen in 17 Vertebratenspezies ermittelt werden, wobei das Programm drei Algorithmen zur Analyse verwendet. Paarweise Alignments mit dem besten Score im Genom jeder Spezies werden mit Hilfe von *blastz* (Chiaromonte et al., 2002) gebildet, deren Ergebnisse verkettet und vernetzt werden. Die paarweisen Alignments werden dann mit *multiz* (Blanchette et al., 2004) nach dem verwendeten Baumdiagramm der untersuchten Spezies in multiple Alignments eingesetzt. Die multiplen Alignments erhalten danach einen Konservierungs-Score von *phastCons* (Siepel, 2005), mit Hilfe eines Baummodells, der aus Alignments über 23 Vertebratenspezies erstellt wird.

3.2.1.1.4.1 Methylierungsanalyse der Kandidaten-microRNAs anhand genomweiter Methylierungsdaten

Im Rahmen der CpG-Insel-Analyse aller Kandidaten-microRNAs wurde auf eine Publikation (Straussman et al., 2009) zurück gegriffen, in der genomweite Methylierungsanalysen aller CpG-Inseln in verschiedenen Geweben und Stammzellen, darunter auch in Leber, durchgeführt worden sind. Mit Hilfe einer neuen Technik, *methyl DNA immunoprecipitation (mDIP) microarray analysis*, wurden die Methylierungsdaten von mehr als 90% aller humanen CpG-Inseln erfasst und als *Plugin* für den *UCSC Genome Browser* verfügbar gemacht. Diese Daten wurden in Form einer von Straussman et al. zur Verfügung gestellten Datei über den *Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) hochgeladen und als zusätzliche Zeilen dargestellt. Die Methylierungsdaten aller CpG-Inseln konnten dadurch als farblich kodierte Balken grafisch sichtbar gemacht werden. Hierbei wurden die \log_2 -transformierten Daten in drei Kategorien eingeteilt: Alle Werte mit einem individuellen Methylierungsscore über dem oberen Schwellenwert wurden als 1 (methyliert) definiert. Sämtliche Werte unter dem unteren Schwellenwert wurden als -1 (unmethyliert) definiert, alle Werte zwischen den Schwellenwerten als 0 (unbestimmt), das heißt schwach methyliert ausgewiesen.

3.2.1.2 Grafische Sequenzanalysen, Plasmid-Vektoranalysen und Alignments

Um alle *in silico* gesammelten Daten aus den Konservierungs-, Methylierungs- und Promotoranalysen grafisch darzustellen, sind die Programme *DNAMan*, *GENtle* und *VectorNTI* verwendet worden. *VectorNTI* vereinigt die Analysemöglichkeiten von *DNAMan* und *GENtle*, da sowohl Sequenzdarstellungen von linearen und zirkulären Nukleinsäuren, als auch grafische Darstellungen von Nukleinsäurebestandteilen und Regulationsmechanismen möglich sind.

Nach einer erfolgreichen Sequenzierung von 5'-RACE-Produkten wurde die Sequenz im FASTA-Format mit dem Vektor und der erwarteten Insertsequenz aligniert. Hierzu wurde *DNAMan* verwendet. Zur Darstellung von Plasmidvektoren ist *GENtle* verwendet worden. Da die Ausgabedateien der Sequenzierungsreaktionen von SeqLab, Göttingen nur mit *GENtle* kompatibel waren, wurden die Dateien mit diesem Programm bearbeitet. Außerdem wurden manuelle Konservierungsanalysen durchgeführt, bei denen Alignments von phylogenetisch verwandten microRNAs in Mammalia und Vertebraten gebildet worden sind.

3.2.2 Primerdesign

Ein wichtiger Bestandteil von Polymerase-Kettenreaktionen sind die jeweilig verwendeten Primer. Sowohl die Lage auf dem genomischen Abschnitt, als auch die individuelle Sequenz beeinflussen das Gelingen einer PCR. Daher wurde auf mehrere Methoden zurück gegriffen, um für die durchgeführten Analysen die optimalen Primer zu entwerfen. Hauptsächlich ist das Programm *PerlPrimer* (Marshall, 2004) verwendet worden, das sowohl für PCR, qRT-PCR und Bisulfit-PCR geeignet ist. Es können die Salzkonzentrationen, gewünschte Amplicons, Ausnahmeregelungen und auch die genomischen Kontextbereiche eingegeben werden, worauf hin eine Liste von geeigneten Primern mit der zu erwartenden Produktgröße ausgegeben wird. Ein weiteres zum Primerdesign verwendetes Programm ist *PrimerExpress 1.0* (PE Applied Biosystems). Hiermit ist hauptsächlich die Annealing-Temperatur der Primer berechnet worden, während die tatsächliche Lage der Primer manuell bestimmt wurde.

Anhand der Regulations- und Konservierungsdaten aus dem *UCSC Genome Browser* wurde eine Reevaluation der Lage der Primer von 23 Kandidaten-microRNAs durchge-

führt, worauf hin für neun microRNAs alternative Primer entworfen wurden (Tabelle 51).

3.2.3 Statistische Datenauswertung und Datenbankerstellung

Zur tabellarischen Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit akkumulierten Daten und der Erstellung einer genomischen und regulatorischen microRNA-Datenbank ist das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft® Office Excel 2003 verwendet worden. Alle statistischen Analysen wurden mit der Statistik-Software Graphpad® Prism 5.0 durchgeführt. Hierzu zählen alle Signifikanzanalysen der differentiellen Methylierung sowie die Korrelationsanalysen der Kandidaten-microRNAs.

3.2.4 microRNA-Zielgenvorhersage

3.2.4.1 Vergleich verschiedener microRNA-Zielgen-Vorhersageprogramme

Bei der Untersuchung von microRNA-gesteuerten Regulationsmechanismen stellt die *in silico* Vorhersage von microRNA-Zielgenen immer noch eine komplexe Aufgabe dar, da die bis dato entwickelten Algorithmen nur teilweise die Reaktionsmechanismen *in vivo* berechnen können. Daher wurde ein Vergleich von zunächst sieben Programmen, *TargetScan.org*, *mirNAMap*, *DIANA TarBase*, *PicTar*, *TargetScanS*, *mirDB* und *miranda*, durchgeführt, um das für weitere Analysen geeignetste Programm zu ermitteln.

Später ist der Untersuchungsumfang um die Programme *DIANA-microT*, *Sanger mir-BASE*, *mirWalk*, *miRecords* und *mirGator* erweitert worden. In Tabelle 48 werden die Eigenschaften der bekanntesten Algorithmen detailliert erklärt (Sethupathy et al., 2006).

DIANA TarBase (Papadopoulos et al., 2009) ist eine manuell erstellte und aktualisierte Datenbank experimentell validierter microRNA-Zielgene. *mirNAMap* 2.0 (Hsu et al., 2006) enthält zum Einen validierte Zielgene aus der Literatur und aus *DIANA TarBase* und benutzt die vier Algorithmen *miranda*, *RNAhybrid*, *SFold* und *TargetScan.org*, um putative Zielgene vorherzusagen. *RNAhybrid* und *SFold* werden hierbei für sterische Berechnungen verwendet. *mirDB* (Wang and El Naqa, 2008) und (Wang, 2008) nutzt

das microRNA-Zielgenvorhersageprogramm *MirTarget2*, das auf *support vector machines* (SVMs) zur Einteilung der Zielgene in Gruppen und einem Trainingsset aus Microarray-Daten basiert. Die *Sanger mirBASE* (Griffiths-Jones et al., 2006) sagt microRNA-Zielgene mit den Algorithmen *microCosm*, *TargetScan.org* und *PicTar* voraus.

Eigenschaft	<i>TargetScan.org</i>	<i>DIANA-microT</i>	<i>miranda</i>	<i>TargetScanS</i>	<i>PicTar</i>
Sequenz					
Regel für perfektes <i>seed match</i>	X			X	
Präferenz für perfektes <i>seed match</i> *					X
Empirisch bestimmte Binderegeln		X			
Dynamische Programmierung					
für <i>alignment score</i> Schwellenwert			X		
Voraussetzung von flankierenden					
5'- und/oder 3'-Sequenzen				X	
Thermodynamik					
ΔG -Berechnungen basierend auf					
klassischen RNA-Faltungsprogrammen	X	X	X		
ΔG Berechnungen basierend auf					
Programmen für Hybridisierungen von					
kurzen Nukleinsäuren					X
Konservierung					
Zwischen Menschen und Nagetieren		X	X**		
Zwischen Menschen, Schimpansen,					
Nagetieren und Hunden	X		X**	X	X
Lage in einer konservierten "Insel"				X	

* *PicTar* sagt bevorzugt Zielgene mit perfekten *seed matches* voraus.

** *miranda* ermöglicht die Vorhersage mit beiden Modellen.

Tabelle 48 Eigenschaften der microRNA-Zielgen-Vorhersageprogramme *Targetscan.org*, *DIANA microT*, *miranda*, *TargetscanS* und *PicTar*. Modifiziert nach (Sethupathy et al., 2006).

microCosm ist ein Programm, das den Algorithmus von *miranda* verwendet. Bei *mirWalk*, *miRecords* und *mirGator* handelt es sich um Websites, die mehrere Algorithmen in unterschiedlicher Konfiguration verwenden, um die Vorteile mehrerer Algorithmen zu maximieren und gleichzeitig deren Nachteile zu minimieren. *MirWalk* und *miRecords* enthalten auch manuell aktualisierte Datenbanken von experimentell validierten Zielgenen. *MirWalk*, eine *public domain* Website (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirWalk/>) verwendet bis zu acht Algorithmen, *RNA22*, *miran-*

da, *mirDB*, *TargetScan*, *RNAhybrid*, *PITA*, *PICTAR* und *DIANA-microT*, deren Schnittmenge als Output geliefert wird. Es können zusätzlich zur Auswahl der Algorithmen auch Transkriptlänge, Genregionen, p-Wert und Seed-Länge zur Spezifizierung der Vorhersage angegeben werden. *MiRecords* (Xiao et al., 2009) ist eine Website (<http://miRecords.biolead.org/>), die elf verschiedene Algorithmen, *DIANA-microT*, *MicroInspector*, *miranda*, *MirTarget2*, *miTarget*, *NBmirTar*, *PicTar*, *PITA*, *RNA22*, *RNAhybrid* und *TargetScan* verwendet, um deren Resultatsumme darzustellen. Hierbei kann die Anzahl an Algorithmen ausgewählt werden, von denen ein Zielgen vorhergesagt wird, um so die Anzahl an vorhergesagten Genen zu minimieren. Bei *mirGator* (<http://genome.ewha.ac.kr/mirGator/>) können sowohl die Summe als auch die Schnittmenge der Vorhersagen von *miranda*, *PicTar* und *TargetScanS* ermittelt werden, wobei im Folgenden auch eine Einteilung in ontologische Cluster sowie eine *in silico* Expressionsanalyse möglich sind (Nam et al., 2008).

Zur Bestimmung des geeignetsten Programms ist eine Zielgenvorhersage mit den Programmen *TargetScan.org*, *mirNAMap*, *DIANA TarBase*, *PicTar*, *TargetScanS*, *mirDB* und *miranda* am Beispiel von Hsa-mir-1 durchgeführt worden. Es wurden die Schnittmengen der Resultate aller Programme sowie die Sensitivität (Trefferquote (%) des jeweiligen Programms) und Spezifität (Kandidaten-Zielgen von (n) Programmen simultan identifiziert) der Programme berechnet. Zur Ermittlung des besten Programms wurde die Sensitivität gegen die Spezifität aufgetragen und der Schnittpunkt beider Kurven zur Evaluierung verwendet.

3.2.4.2 Eine neue Methode zur microRNA-Zielgen-Vorhersage

Nachdem diese erste Testreihe abgeschlossen war, wurde eine neue Methode etabliert, bei der ein Score-basiertes System die in der Literatur am häufigsten zusammen verwendeten Algorithmen *TargetScanS/Targetscan 5.1*, *PicTar* und *miranda* als Datenquelle einsetzt (sofern eine microRNA bei *TargetScanS* gelistet war, wurde dieser Algorithmus benutzt; andernfalls *Targetscan.org 5.1*). Es wurde zunächst die Summe der Ergebnisse der drei Algorithmen gebildet, wobei ein erster Score vergeben worden ist. Jedes von einem oder mehreren Algorithmen mehrfach genannte Gen wurde gezählt, diese Zahl als erster Score des Gens aufgelistet und redundante Einträge somit entfernt. Als Schwellenwert wurden nur Gene, deren Score ≥ 3 ist, in die finale Liste aufgenommen.

Zum Test der Effizienz der neuen Methode dienten die drei Programme *mirWalk*, *mirGator* und *miRecords*, die die neuesten Entwicklungen in der microRNA-Zielgenvorhersage repräsentieren. Diese sind wie folgt konfiguriert worden: Bei *mirWalk* wurde die Schnittmenge der Algorithmen von *TargetScanS/Targetscan*, *miranda* und *PicTar5* ausgewählt (Auswahl von: All Transcripts, Human, 3'+5' UTR, Promotor, CDS; die restlichen Einstellungen blieben beim Standard), bei *mirGator* wurde die Summe der Algorithmen von *TargetScanS*, *miranda* und *PicTar5* (Auswahl von: OR für alle Algorithmen) verwendet und bei *miRecords* wurde die Schnittmenge aus mindestens 3 Algorithmen (*DIANA-microT*, *MicroInspector*, *miranda*, *MirTarget2*, *miTarget*, *NB mirTar*, *PicTar*, *PITA*, *RNA 22*, *RNA hybrid* und *TargetScan/TargetScanS*) betrachtet. Die redundanten Einträge aus den Zielgenlisten von *mirWalk*, *mirGator* und *miRecords* wurden entfernt.

Zur Auswertung wurden je microRNA die Anzahl der putativen Zielgene und die Anzahl der experimentell validierten Zielgene (<http://miRecords.biolead.org/index.php>) aufgeführt. Die Anzahl an validierten Zielgenen, die von der jeweiligen Methode vorhergesagt worden ist, wurde als zweiter Score aufgeführt. Als finaler Score wurde abschließend der Quotient aus der Anzahl der vorhergesagten Zielgene und der Anzahl der putativen Zielgene je Methode gebildet.

3.2.4.3 *In Silico* Analyse der validierten Targets der Kandidaten-microRNAs

Für eine detaillierte Analyse der Zielgene der Kandidaten-microRNAs sind deren validierte Zielgene mit Hilfe von *miRecords*, *DIANA TarBase* und *MMMP* (Mocellin and Rossi, 2008) ermittelt worden. Aussagen über Physiologie und Onkologie wurden *MMMP* entnommen, einer Website, auf der Daten über Gene, Krankheiten und Therapiemöglichkeiten vorwiegend aus der Melanomforschung, jedoch auch aus anderen onkologischen Bereichen, in Form einer frei zugänglichen Datenbank (<http://www.MMMP.org/MMMP/biocard.MMMP>) zusammengefasst sind. Die somit ermittelten Zielgene und deren Funktionen sollten einen ersten Überblick über die putativen Regulationsmechanismen der microRNAs liefern.

3.2.5 MicroRNA-Expressionsdaten anhand der Datenbank *mirZ*

Mit einer *in silico* Expressionsanalyse der Kandidaten-microRNAs sollte ein Zusammenhang zwischen Methylierung und Expression überprüft werden. Hierzu wurde die Datenbank *mirZ* (Hausser et al., 2009) verwendet, welche Daten aus zahlreichen Geweben und Tumoren, unter anderem gesunde Leber, HCC Primärtumoren und HCC-Zelllinien enthält. Die Expressionsdaten aller Kandidaten-microRNAs sind abgefragt und mit Hilfe der website-internen Visualisierung grafisch dargestellt worden. Hierzu wurde *mirNA expression profiles* auf der Startseite (<http://www.mirZ.unibas.ch/>) ausgewählt, dann *Visualization of MirNA Profiles*, wobei *Human* und *liver* als Organismus und Gewebe ausgewählt wurden. Alle Kandidaten-microRNAs sowie *Clustering display based on Groups/Clusters* wurden ausgewählt und mit *generate Profile* die Abfrage gestartet.

3.2.6 GO Clustering mit *DAVID 2008*

Die vorhergesagten Zielgene der Kandidaten-microRNAs nach der in dieser Arbeit neu entwickelten Methode sind mit Hilfe des Programms *DAVID 2008 (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery)* in ontologische Cluster eingeteilt worden, um strukturiertere Folgeanalysen durchführen zu können (Huang da et al., 2009) und (Dennis et al., 2003). Mit der Option *Functional Annotation* wurde in Anlehnung an die Methode von Y. Gusev (Gusev, 2008) eine Einteilung der microRNA-Zielgene in funktionelle Cluster vorgenommen (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>). Die Sortierung erfolgte hierbei in Prioritätsreihenfolge nach dem jeweiligen p-Wert. Es wurde hierzu zunächst die Genliste (*Official Gene Symbol*) hochgeladen und *Homo sapiens* als *Background* ausgewählt. Zur Analyse wurden nur die beiden Ontologie-Optionen *GOTERM_BP_1* und *GOTERM_BP_2* verwendet und *Functional Annotation Clustering* ausgewählt. Abschließend sind die Resultate mit Microsoft® Office Excel 2003 grafisch dargestellt worden.

In einer zweiten Analyse sollten onkologisch relevante Kategorien qualitativ ermittelt werden. Hierzu wurde *Functional Annotation* ausgewählt und nur die *Pathways*-Optionen *KEGG_PATHWAY*, *EC_NUMBER* und *BIOCARTA* verwendet. Hierbei ergaben sich Genlisten, die bestimmten Krankheiten oder Signalwegen zugeordnet sind.

3.2.7 Genomische und regulatorische microRNA-Datenbank

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine manuell aktualisierte microRNA-Datenbank erstellt, die putative Promotoren (*WWW Promoter Scan*), CpG-Inseln (*CpG-Island Searcher* sowie *CpGplot*) und putative Regulationsmechanismen (*UCSC Genome Browser*) aller CpG-Insel-assoziierten microRNAs enthält. Des Weiteren sind darin genomische Daten über die Lage der microRNAs auf Exons oder Introns sowie ein putativ geclustertes Auftreten verzeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Strategie zur Auffindung aberrant methylierter microRNAs

Um herauszufinden, welche microRNAs als im HCC differentiell methylierte Kandidaten in Frage kommen könnten, sind zunächst alle zum damaligen Zeitpunkt (Stand März 2007) bekannten microRNAs (n=463) auf CpG-Insel-Assoziation untersucht worden (Lehmann et al., 2008). Hierzu wurden die zwei CpG-Insel-Vorhersageprogramme *CpG-Island Searcher* und *CpGplot* verwendet.

Als untersuchter genomischer Kontext diente hierbei ein 4000bp großer Bereich um die Precursor-microRNA, der durch den Standardbereich beim Download einer microRNA aus dem *ENSEMBL-Genome-Browser* (<http://www.ensembl.org/>) festgelegt ist. Die Vorhersagekriterien zur CpG-Insel-Berechnung sind nach Takai et Jones, 2002 (Takai and Jones, 2002) gewählt worden. Es wurden nur diejenigen CpG-Inseln als putativ promotorassoziiert definiert, die sich im 5'-Bereich der muren microRNA befinden. Demzufolge ließ sich bei 68/463 microRNAs (14,7%) eine CpG-Insel-Assoziation feststellen.

Alle CpG-Insel-assoziierten microRNAs (n=68) wurden mittels COBRA in drei HCC-Zelllinien (Huh-7, HLE und HLF) und gesunder Leber (LE31, Spenderleber von einem 52 Jahre alten Patienten) untersucht. Hierbei zeigte sich bei 56/68 microRNAs (82,4%) keine differentielle Methylierung.

Alle stark differentiell methylierten microRNAs (n=12) sind darauf hin in zehn HCC-Primärtumoren und gesunder Leber von drei Patienten mittels COBRA untersucht worden. Um diese Daten zu validieren und auf Tumorspezifität auszudehnen, wurden COBRA-Analysen in HCC-Primärtumoren und deren angrenzendem LNG durchgeführt.

Aus dieser COBRA-Analyse ergaben sich fünf microRNA-Kandidaten (Hsa-mir-9-1, Hsa-mir-92b, Hsa-mir-203, Hsa-mir-596 und Hsa-mir-663). Des Weiteren wurden vier Kandidaten aus der Literatur, Hsa-mir-1, Hsa-mir-34a und Hsa-mir-124-2 (Tabelle 49) und aus früheren Daten der AG-Lehmann (Hsa-mir-9-2) zur näheren Untersuchung ausgewählt.

Autor	Journal (Jahr, Ausgabe)	Untersuchte microRNAs	Methylierungsanalysen	Patientenproben (Zahl)	Patientenproben (Art)	Ergebnisse
Lujambio et al.	Cancer Res, Feb 2007, 4	miR-124a1, miR-124a2, miR-124a3	MSP, Bisulfitssequenzierung	208 Tumore, 22 Normalgewebe (Kolon, Brust, Lunge, Leukämie, Lymphom, Neuroblastom, Sarkom)	keine Angaben	miR-124a1, miR-124a2, miR-124a3 sind in Kolon, Brust, Lunge, Leukämie und Lymphomen hypermethyliert
Weber et al.	Cell Cycle, Mai 2007, 9	miR-15a-16 cluster, miR-17-20 cluster, miR-155, let-7g, miR-127, miR-124a, let-7a-3, miR-200c	n/a	n/a	n/a	miR-124a ist in normalem Kolongewebe unmethyliert, aber in primären Kolonkarzinomen hypermethyliert
Lujambio et Esteller	Cell Cycle, Jun 2007, 12	miR-127, miR-124a, miR-373 and miR-517c	n/a	n/a	n/a	Die miR-124a-Familie ist in Tumorzellen methyliert
Lehmann et al.	J Pathol, Jan 2006, 1	miR-9-1, miR-124a3, miR-148, miR-152, and miR-663	COBRA, Bisulfitssequenzierung, Pyrosequenzierung	71 primäre Mammakarzinome und 33 histologisch normale Brustgewebeproben	krassenverteilte Biopsien	miR-9-1, miR-124a3, miR-148, miR-152, und miR-663 im Brustkrebs hypermethyliert
Kozaki et al.	Cancer Res, Apr 2008, 7	miR-34b, miR-132, miR-137, miR-199a, miR-203	COBRA, Bisulfitssequenzierung	11 OSCC aus Patienten	krassenverteilte Biopsien	miR-34b war nicht differenziell methyliert
Toyota et al.	Cancer Res, Jun 2008, 11	miR-34b/c	MSP, Bisulfitssequenzierung, Pyrosequenzierung	111 kolorektale Karzinome, 17 normale kolorektale Schleimhäut	krassenverteilte Biopsien	MicroRNA-34b/c in 101 von 111 (90%) primären Kolorektalen Karzinomen methyliert, schwache oder keine Methylierung in normaler Kolonschleimhaut
Datta et al.	Cancer Res, Jul 2008, 13	miR-1-1	COBRA, Bisulfitssequenzierung	4 HCC und angrenzendes LNS	krassenverteilte Biopsien	miR-1-1 in 2/4 Tumoren hypermethyliert
Lodjgin et al.	Cell Cycle, Aug 2008, 16	miR-34a	MSP, Bisulfitssequenzierung	24 primäre Prostatakarzinome, 3 Tumorfrie Prostatastromata	FFPE-Gewebe	Hsa-miR-34a in 24/110 humanen Zellenlinien hypermethyliert, keine Methylierung in Prostatastroma.
Lujambio et al.	PNAS, Sep. 2008, 38	miR-34b/c, miR-148a, miR-9-1, miR-9-2, miR-9-3	MSP, Bisulfitssequenzierung	278 Tumore (Kolon, Lunge, Brust, Kopf-Hals-Karzinome und Melanome, 32 Normalgewebe	keine Angaben	19/24 Prostatacarcinome hypermethyliert (MSP) Hsa-miR-34b/c, Hsa-miR-148a, Hsa-miR-9-1, Hsa-miR-9-2, Hsa-miR-9-3 hypermethyliert in Kolon, Lunge, Brust, Kopf-Hals-Karzinomen und Melanomen
Roman-Gomez et al.	J Clin Oncol, Mär 2009, 8	miR-9-1, miR-9-2, miR-9-3, miR-10b, miR-34b, miR-34c, miR-124a1, miR-124a2, miR-124a3, miR-132, miR-196b, miR-203 und miR-212	MSP, qRT-MSP	353 konsekutive Patienten	keine Angaben	Methylierung (%) in akuter lymphoblastischer Leukämie: 49% miR-124a1, 46% miR-124a2, 42% miR-124a3, 34% miR-34b/c, 34% for miR-9-1, 33% miR-9-3 und 21% miR-9-2
Furdia et al.	Carcinogenesis, Okt 2009, n/a	miR-124a1, miR-124a2, miR-124a3	COBRA, Bisulfitssequenzierung	23 HCC und angrenzende LNS, 2 gesunde Leberproben	krassenverteilte Biopsien	Tumorspezifische Methylierung von miR-124-1: 28,1% (6/23), miR-124-2: 30,4% (7/23), und miR-124-3: 82,6% (19/23) in HCC-Primärtumoren; einige Fälle von Hypermethylierung im Normalgewebe

Tabelle 49 Publierte Methylierungsanalysen. Untersuchungen zu den in dieser Arbeit ermittelten microRNA-Kandidaten.

microRNA	Chromosom (Strang)	Lokalisation (bp)
Hsa-mir-1-1	20 (+)	60561958-60562028
Hsa-mir-9-1	1 (-)	154656757-154656845
Hsa-mir-9-2	5 (-)	87998427-87998513
Hsa-mir-9-3	15 (+)	87712252-87712341
Hsa-mir-34a	1 (-)	9134314-9134423
Hsa-mir-34b	11 (+)	110888873-110888956
Hsa-mir-34c	11 (+)	110889374-110889450
Hsa-mir-92b	1 (+)	155164968-155165063
Hsa-mir-124-1	8 (-)	9798308-9798392
Hsa-mir-124-2	8 (+)	65454260-65454368
Hsa-mir-124-3	20 (+)	61280297-61280383
Hsa-mir-148a	7 (-)	25956064-25956131
Hsa-mir-203	14 (+)	104583742-104583851
Hsa-mir-596	8 (+)	1752804-1752880
Hsa-mir-663	20 (-)	26136822-26136914

Tabelle 50 Chromosomale Lokalisation der microRNA-Kandidaten.

Außerdem wurden die fehlenden Mitglieder von microRNA-Familien ergänzt (Hsa-mir-9-3, Hsa-mir-34b, Hsa-mir-34c, Hsa-mir-124-1 und Hsa-mir-124-3).

Die chromosomale Lage aller microRNA-Kandidaten ist danach verglichen worden (Tabelle 50), um auszuschließen, dass ähnliche Methylierungsmuster dieser microRNAs aufgrund einer Assoziation mit den selben CpG-Inseln entstanden sind.

Hsa-mir-34b und Hsa-mir-34c sind die einzigen microRNAs, die geclustert auftreten, da deren Precursor-Sequenzen nur 418bp auseinander liegen. Da sie wahrscheinlich coexprimiert und coreguliert werden (Toyota et al., 2008) und (Lujambio et al., 2008), wurde nur ein Pyrosequenzierungsassay für die CpG-Insel beider microRNAs erstellt.

microRNA	
Hsa-let-7i	Hsa-mir210
Hsa-mir124-1	Hsa-mir345
Hsa-mir193b	Hsa-mir572
Hsa-mir203	Hsa-mir658

Tabelle 51 Neudesign der PCR-Primer anhand Reevaluation der putativen Promotoren.

Aufgrund einer Reevaluation der Promotorstruktur sowie der Lage von putativen CpG-Inseln war ein Primerneudesign bei einigen der untersuchten microRNAs erforderlich (Tabelle 51).

Bei der Untersuchung der Kandidaten mittels Pyrosequenzierung sind zunächst 31 Paare von HCC-Primärtumoren mit deren angrenzendem, nicht-neoplastischen Lebergewebe betrachtet worden. Der Probenumfang wurde im Folgenden auf gesunde Leber und Zirrhose ausgedehnt; die stark differentiell methylierten Kandidaten wurden zusätzlich auch in FLC's, Leberadenomen, FNH's, Siderosen ohne HCC und kindlichen HC's untersucht.

4.2 Molekularbiologische Analysen

4.2.1 Methylierungsanalysen von CpG-Insel assoziierten microRNAs

4.2.1.1 Semiquantitative Methylierungsanalyse (COBRA)

In der ersten Analysereihe wurde der Methylierungsgrad von 68 CpG-Insel assoziierten microRNAs in HCC-Zelllinien und gesunder Leber mittels COBRA-Analysen bestimmt. Hierbei wurden die Bandenintensitäten (Abbildung 10) von geschnittenem und ungeschnittenem iPCR-Produkt verglichen und somit eine semiquantitative Einteilung des Methylierungsgrades der Allele des Zielgens vorgenommen.

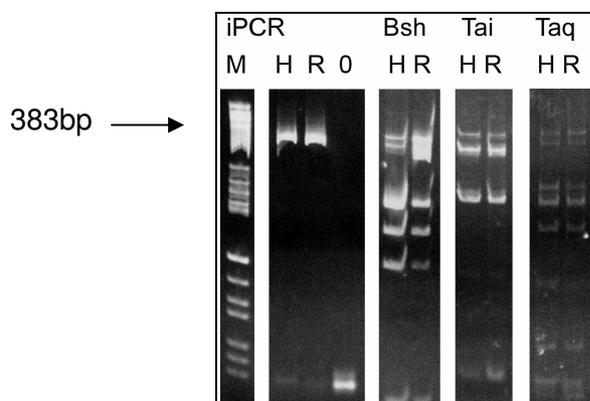


Abbildung 10 iPCR-Produkt und Restriktionsfragmente von Hsa-mir-659. Primerpaar mir-659-1i5'/1i3' (383bp); M=pBR322 DNA Marker; H= HLF; R= Raji; 0= NTC.

Eine Probe wurde als unmethyliert eingeteilt, wenn nur ein ungeschnittenes Fragment erkennbar war. Schwach methylierte Proben zeigten gerade noch erkennbare Restriktionsfragmente, deutlich methylierte Proben wiesen kumulative Intensitäten der Restriktionsfragmente in der selben Größenordnung wie das Hauptprodukt auf und stark methylierte Proben zeigten sehr gut erkennbare Restriktionsfragmente, deren kumulative Intensitäten größer als die des Hauptprodukts waren. Proben, bei denen das Hauptprodukt komplett geschnitten war, wurden ebenfalls als stark methyliert bezeichnet (Abbildung 11).

Zelllinie/microRNA	let-7-a3	let-7i	9-1	9-3	34b	34c	92b	124a-1	124a-3	126
Huh-7										
HLE										
HLF										
LE31										
	127	133a-2	148a	149a-2	152	153-1	191	193a	193b	196b
Huh-7										
HLE										
HLF										
LE31										
	200a	200b	202	203	208a	210	212	219-1	219-2	320
Huh-7										
HLE										
HLF										
LE31										
	339	345	369	372	373	375	378	409	410	412
Huh-7										
HLE										
HLF										
LE31										
	423	424	425	433	484	503	560	564	565	572
Huh-7										
HLE										
HLF										
LE31										
	574	594	596	611	615	632	637	638	639	656
Huh-7										
HLE										
HLF										
LE31										
	658	659	661	663	675	760	886	933		
Huh-7										
HLE										
HLF										
LE31										

Legende:	
	Messung fehlgeschlagen
	keine Daten
	unmethyliert
	schwach methyliert
	deutlich methyliert
	stark methyliert

Abbildung 11 Methylierungsgrad von 68 CpG-Insel assoziierten microRNAs. Methylierungsdaten nach COBRA von den drei HCC-Zelllinien Huh-7, HLE und HLF sowie einem Fall gesunder Leber (LE31).

Nach dieser Untersuchung ergaben sich zwölf differenziell methylierte microRNAs, deren Methylierungsmuster einen deutlichen Unterschied zwischen HCC-Zelllinien und gesunder Spenderleber erkennen ließ (Tabelle 52).

microRNA		
Hsa-mir-9-1	Hsa-mir-92b	Hsa-mir-124a-1
Hsa-mir-193b	Hsa-mir-196b	Hsa-mir-203
Hsa-mir-425	Hsa-mir-572	Hsa-mir-596
Hsa-mir-638	Hsa-mir-658	Hsa-mir-663

Tabelle 52 MicroRNA-Kandidaten nach Analyse in Zelllinien.

Da die Methylierung in HCC-Zelllinien nur ein Indiz, jedoch kein Beweis für die Situation *in vivo* ist, sollte diese differentielle Methylierung der 12 microRNA-Kandidaten darauf hin in drei Probengruppen von zehn HCC-Primärtumoren, 17 Fällen Siderose mit HCC sowie 13 gesunden Lebern untersucht werden (Abbildung 12).

Gewebe/Tumor	9-1	92b	124a-1	193b	196b	203	425	572	596	638	658	663
HCC-Primärtumore												
HCC50												
HCC51												
HCC52												
HCC53												
HCC54												
HCC55												
HCC56												
HCC57												
HCC58												
HCC59												
Siderose mit HCC												
HCHCC1												
HCHCC2												
HCHCC3												
HCHCC4												
HCHCC5												
HCHCC6												
HCHCC7												
HCHCC8												
HCHCC9												
HCHCC10												
HCHCC11												
HCHCC12												
HCHCC13												
HCHCC14												
HCHCC15												
HCHCC16												
HCHCC17												
gesunde Leber												
LE21												
LE22												
LE23												
LE24												
LE25												
LE26												
LE27												
LE28												
LE29												
LE30												
LE31												
LE32												
LE33												

Legende:	Messung fehlgeschlagen
	keine Daten
	unmethyliert
	schwach methyliert
	deutlich methyliert
	stark methyliert

Abbildung 12 Methylierungsgrad von 12 differentiell methylierten microRNAs. Methylierungsdaten nach COBRA von 10 HCC-Primärtumoren, 17 Fällen Siderose mit HCC und 13 Fällen gesunder Leber.

Als nächstes sind die Untersuchungen auf HCC-Primärtumore und angrenzendes LNG des selben Individuums ausgedehnt worden, um eine tumorspezifische, differentielle Methylierung der analysierten microRNAs nachzuweisen. Hierzu wurde eine Kohorte

von 31 HCC-Patienten betrachtet, von denen kryoasservierte Biopsien verfügbar waren (Abbildung 13).

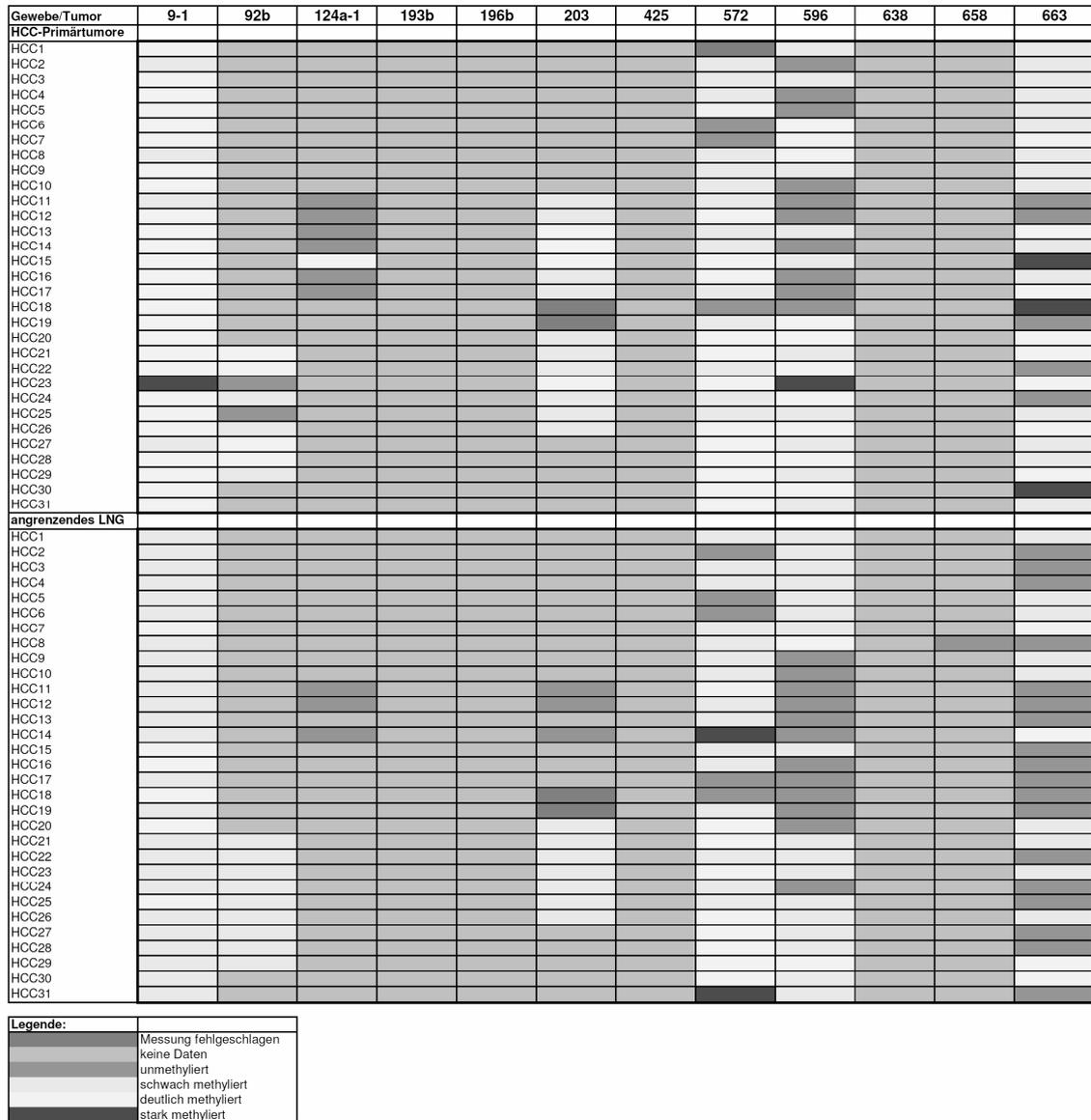


Abbildung 13 Methylierungsgrad von 12 differentiell methylierten microRNAs. Methylierungsdaten nach COBRA von 31 HCC-Primärtumoren und angrenzendem, nicht-neoplastischen Lebergewebe.

Nach der Analyse in HCC-Primärtumoren mit deren angrenzendem LNG verblieben die microRNAs Hsa-mir-9-1, Hsa-mir-596 und Hsa-mir-663 als Kandidaten, die eine deutliche, differentielle Methylierung von Tumor und angrenzendem Normalgewebe aufwiesen.

Die COBRA-Untersuchungen lieferten somit drei putativ differentiell methylierte microRNAs mit einer im Tumor beobachteten Hypermethylierung.

4.2.1.2 Qualitative Methylierungsanalyse (MSP)

Alternativ zur COBRA wurde auch die Methylierungsspezifische PCR (MSP) zur Bestimmung des Methylierungsgrades der microRNA-Kandidaten eingesetzt, da diese Methode einen schnelleren Überblick über den Methylierungszustand eines untersuchten Probenkollektivs liefert. Es wurden die microRNAs Hsa-mir-9-3, Hsa-mir-34a, Hsa-mir-124-1 und Hsa-mir-124-3 mittels MSP analysiert, da hierfür bereits etablierte MSP-Assays publiziert worden waren. Bei vollständig methylierten Proben zeigte sich nur eine (M)-Bande, bei vollständig unmethylierten Proben nur eine (U)-Bande und bei mittelmäßig methylierten Proben zwei Banden, (M) und (U), mit unterschiedlichen Intensitäten (Abbildung 14). Anhand der Bandenintensität bzw. des völligen Fehlens der PCR-Produkte konnte eine qualitative Einteilung des Methylierungsgrades (unmethyliert, schwach methyliert, stark methyliert) erfolgen.

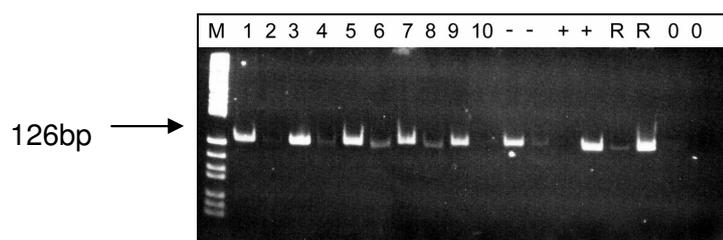


Abbildung 14 Methylierungsspezifische PCR (MSP) von Hsa-mir-34a. Verwendete Primerpaare mir34U1/U2.r (126bp) und mir34aM1/M2.r (122bp); Je Probe ist zuerst das (U)-, dann das (M)-PCR-Produkt aufgetragen; M=pBR322 DNA Marker; 1,2= HCC27 (angr. LNG); 3,4= HCC28 (angr. LNG); 5,6= HCC29 (angr. LNG); 7,8= HCC30 (angr. LNG); 9,10= HCC31 (angr. LNG); -,=- NC MCF-7 (unmethyliert); +,+ = PC KG1a (methyliert); R,R= Raji; 0,0= NTC.

Zunächst wurden die PCR-Produkte, wie in Abbildung 14 dargestellt, auf einem PAA-Gel analysiert und die Bandenintensitäten visuell verglichen.

Zur besseren Übersicht sind die Methylierungsdaten der microRNA-Kandidaten aus der MSP und aus der COBRA zusammenfassend in einem schwarz/weiß Schema abgebildet worden, welches die differentielle Methylierung der einzelnen Proben darstellt (Abbildung 15). War die Methylierung im Tumor stärker als im LNG, so wurde dieser mit einem schwarzen Kästchen markiert. Wenn das LNG stärker als der Tumor methyliert war, wurde dies mit einem dunkelgrauen Kästchen angezeigt. Bei gleich starker Methylierung sind beide Kästchen weiß gelassen worden.

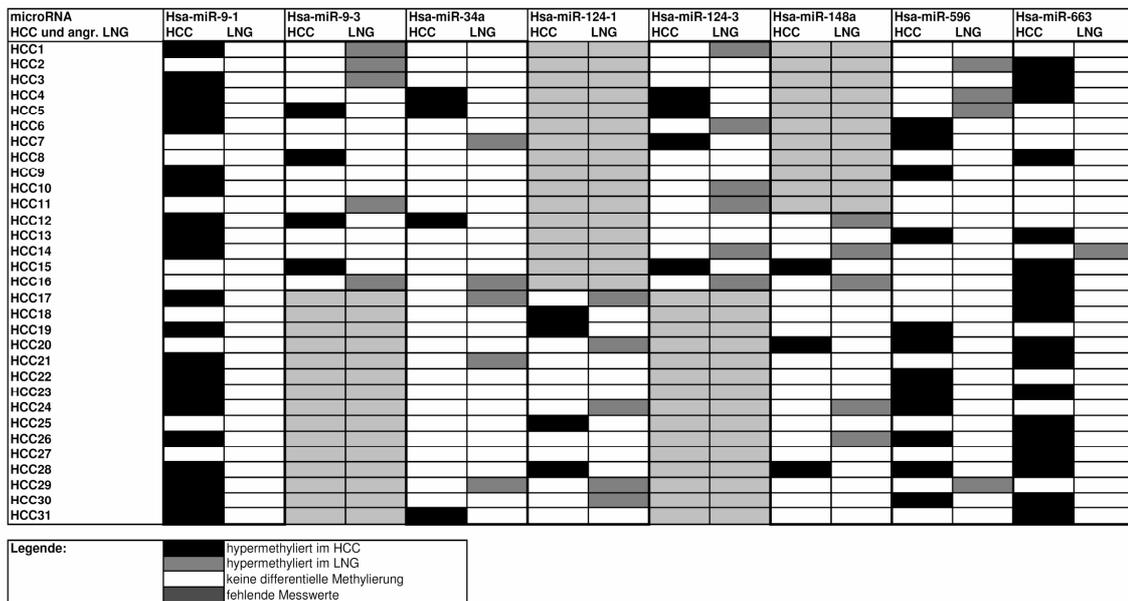


Abbildung 15 Zusammenfassung der Methylierungsdaten der microRNA-Kandidaten aus COBRA und MSP-Analysen. Schwarz/Weiß-Darstellung der COBRA-Daten von Hsa-mir-9-1, Hsa-mir-148a, Hsa-mir-596 und Hsa-mir-663; Schwarz/Weiß-Darstellung der MSP-Daten von Hsa-mir-9-3, Hsa-mir-34a, Hsa-mir-124-1 und Hsa-mir-124-3.

Die microRNAs Hsa-mir-9-1, Hsa-mir-596 und Hsa-mir-663 blieben die stärksten Kandidaten, da bei ihnen die gemessene Hypermethylierung am häufigsten auftrat: Bei Hsa-mir-9-1 waren 21/31 Tumorproben (68%) hypermethyliert, bei Hsa-mir-596 konnte in 12/31 Tumorproben (39%) eine Hypermethylierung festgestellt werden und bei Hsa-mir-663 waren 18/31 Tumorproben (58%) hypermethyliert.

Da jedoch präzisere, quantifizierbare Aussagen über die Methylierung getroffen werden sollten, wurden Pyrosequenzierungen sowie qRT-MSP-Analysen durchgeführt.

4.2.1.3 Quantitative Methylierungsanalyse (Pyrosequenzierung)

Basierend auf den Analysen zur CpG-Insel-Vorhersage und Promotorvorhersage der microRNA-Kandidaten sind Pyrosequenzierungs-Assays erstellt worden, mit denen eine putativ regulatorische Region im 5'-Bereich der microRNAs untersucht wurde.

Die in der Pyrosequenzierung untersuchten Abschnitte der putativen microRNA-Promotoren mussten zunächst mit einer iPCR für Pyrosequenzierungen amplifiziert werden, wobei Primer mit einem biotinylierten Anhang verwendet worden sind (Abbildung 16).

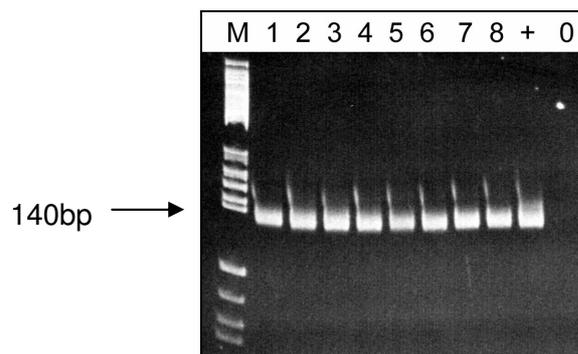


Abbildung 16 iPCR für die Pyrosequenzierung von Hsa-mir-9-1. Primerpaar mir-9-1 6i5'/4i3'-tail (Produktgröße= 140bp); M= pBR322 DNA Marker; 1-8= FNH1-FNH8; += Raji; 0= NTC.

Das iPCR-Produkt wurde nach erfolgreicher Gelkontrolle sequenziert, sodass die Ergebnisse der Sequenzierungsreaktion anhand eines Pyrogramms ausgewertet werden konnten (Abbildung 17).

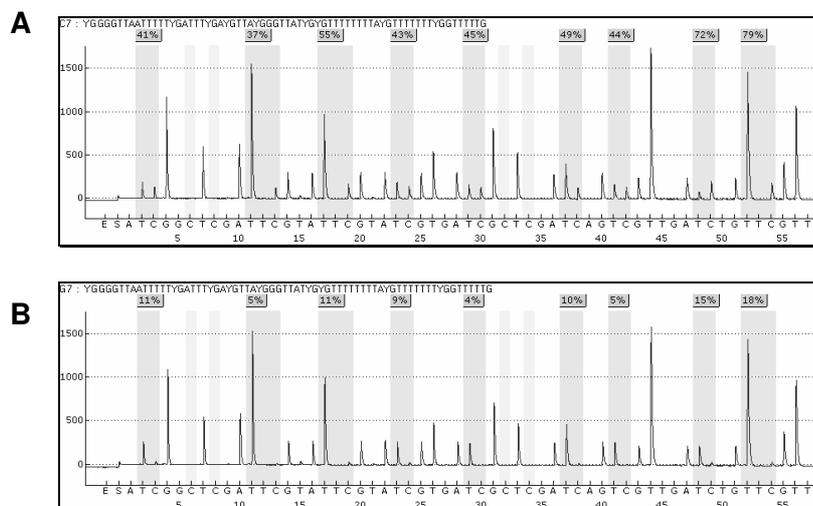


Abbildung 17 Pyrogramme der microRNA Hsa-mir-9-1. Probenpaar HCC23; (A) HCC Primärtumor; (B) angrenzendes nicht-neoplastisches Lebergewebe; X-Achse: Sequenz; Y-Achse: Intensität der Fluoreszenz; beige Balken: Konversionskontrollen; graue Flächen: CpG-Dinukleotide; blau hinterlegte Zahlen: prozentuale Methylierung der Allele sowie Qualität der Daten (blau=gut; gelb=fragwürdig; rot=nicht auszuwerten).

Es wurden HCC-Primärtumore (HCC), HCC-Primärtumore von Patienten <40 Jahren (junge HCC's), Fibrolamelläre Karzinome (FLC) sowie Leberadenome (LA) und deren angrenzende, nicht neoplastische Normalgewebe (angr. LNG) untersucht. Als Kontrollen dienten Leberzirrhosen, gesunde Leber, fokal noduläre Hyperplasien (FNH), Siderosen ohne HCC und kindliche Hämochromatosen (kindliche HC).

Parallel zu den Analysen in Patientenmaterial ist die Methylierung der untersuchten microRNAs auch in HCC-Zelllinien gemessen worden, um einen Vergleich zur Methylierung *in vivo* zu erhalten (Abbildung 29).

Ausgehend von den Methylierungsdaten der einzelnen CpG-Dinukleotide (prozentuale Werte in blauem Kästchen) ist die mittlere Methylierung aller CpG-Dinukleotide einer Sequenz berechnet und für die weitere Analyse verwendet worden.

Die somit berechneten Mittelwerte wurden in einer statistischen Analyse eingesetzt, in der die einzelnen Gewebe- und Tumorgruppen mit einem two-tailed Mann-Whitney t-Test mit 95% CI (ns [nicht signifikant] $p > 0,05$; * [schwach signifikant] $p < 0,05$; ** [signifikant] $p < 0,01$ und *** [hoch signifikant] $p < 0,001$) miteinander verglichen wurden, um signifikante Unterschiede, zum Beispiel zwischen Primärtumor und angrenzendem Normalgewebe, festzustellen (Abbildung 18 ff.). Es wurde außerdem nach signifikanten Differenzen der Methylierung in den Kontrollgruppen gesucht und diese gegebenenfalls dargestellt.

Die Häufigkeiten der auftretenden Hypermethylierungen wurden in sehr häufig: mehr als 66,6%, häufig: mehr als 33,3%, gelegentlich: mehr als 10,0% und selten: 0%-9,9% bei individuellen Probenvergleichen eingeteilt.

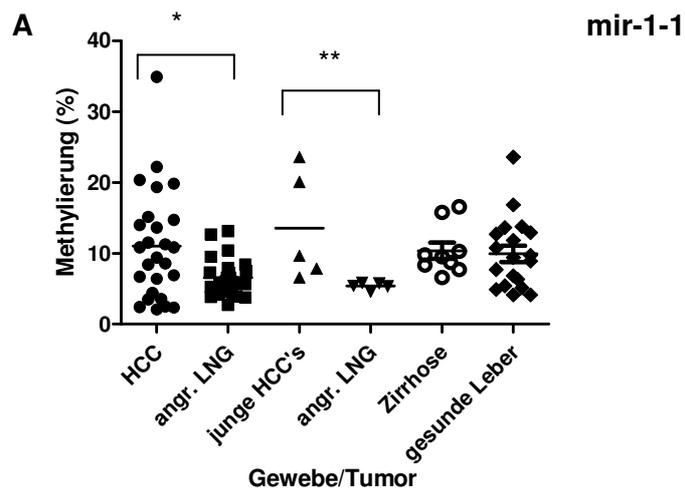


Abbildung 18 Methylierung von Hsa-mir-1-1. Methylierungswerte der microRNA-Kandidaten anhand Pyrosequenzierungsdaten und Ergebnisse des two-tailed Mann-Whitney t-Test mit 95% CI; (A) Hsa-mir-1-1; Darstellung des Mittelwertes mit SEM; Abkürzungen: HCC-Primärtumore (HCC), HCC-Primärtumore von Patienten <40 Jahren (junge HCC's), angrenzende, nicht neoplastische Normalgewebe (angr. LNG).

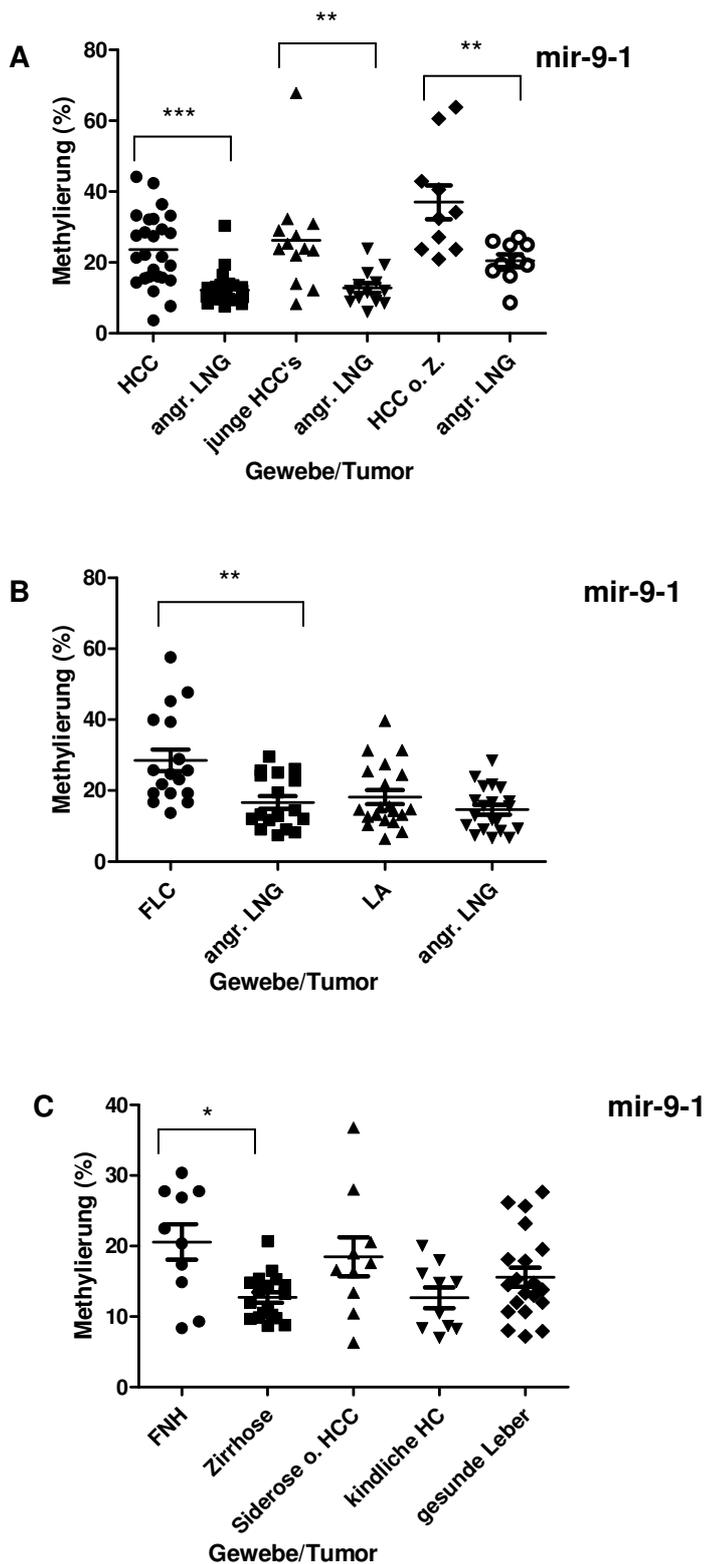


Abbildung 19 Methylierung von Hsa-mir-9-1. Methylierungswerte der microRNA-Kandidaten anhand Pyrosequenzierungsdaten und Ergebnisse des two-tailed Mann-Whitney t-Test mit 95% CI; (A), (B), (C) Hsa-mir-9-1; Darstellung des Mittelwertes mit SEM; Abkürzungen: HCC-Primärtumore (HCC), HCC-Primärtumore von Patienten <40 Jahren (junge HCC's), HCC ohne Zirrhose (HCC o. Z.), angrenzende, nicht neoplastische Normalgewebe (angr. LNG), Fibrolamelläre Karzinome (FLC), Leberadenome (LA), fokale noduläre Hyperplasien (FNH), kindliche Hämochromatosen (kindliche HC).

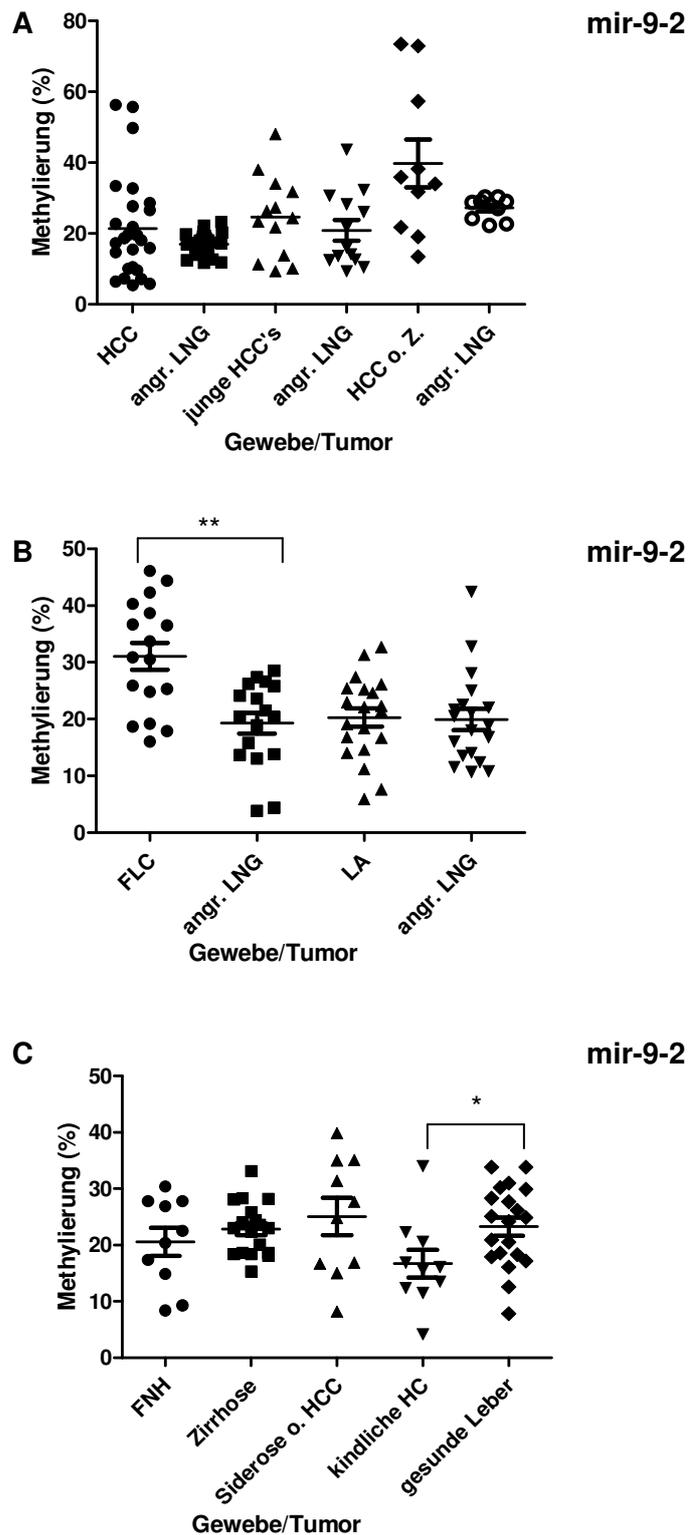


Abbildung 20 Methylierung von Hsa-mir-9-2. Methylierungswerte der microRNA-Kandidaten anhand Pyrosequenzierungsdaten und Ergebnisse des two-tailed Mann-Whitney t-Test mit 95% CI; (A), (B), (C) Hsa-mir-9-2; Darstellung des Mittelwertes mit SEM; Abkürzungen: HCC-Primärtumore (HCC), HCC-Primärtumore von Patienten <40 Jahren (junge HCC's), HCC ohne Zirrhose (HCC o. Z.), angrenzende, nicht neoplastische Normalgewebe (angr. LNG), Fibrolamelläre Karzinome (FLC), Leberadenome (LA), fokale noduläre Hyperplasien (FNH), kindliche Hämochromatosen (kindliche HC).

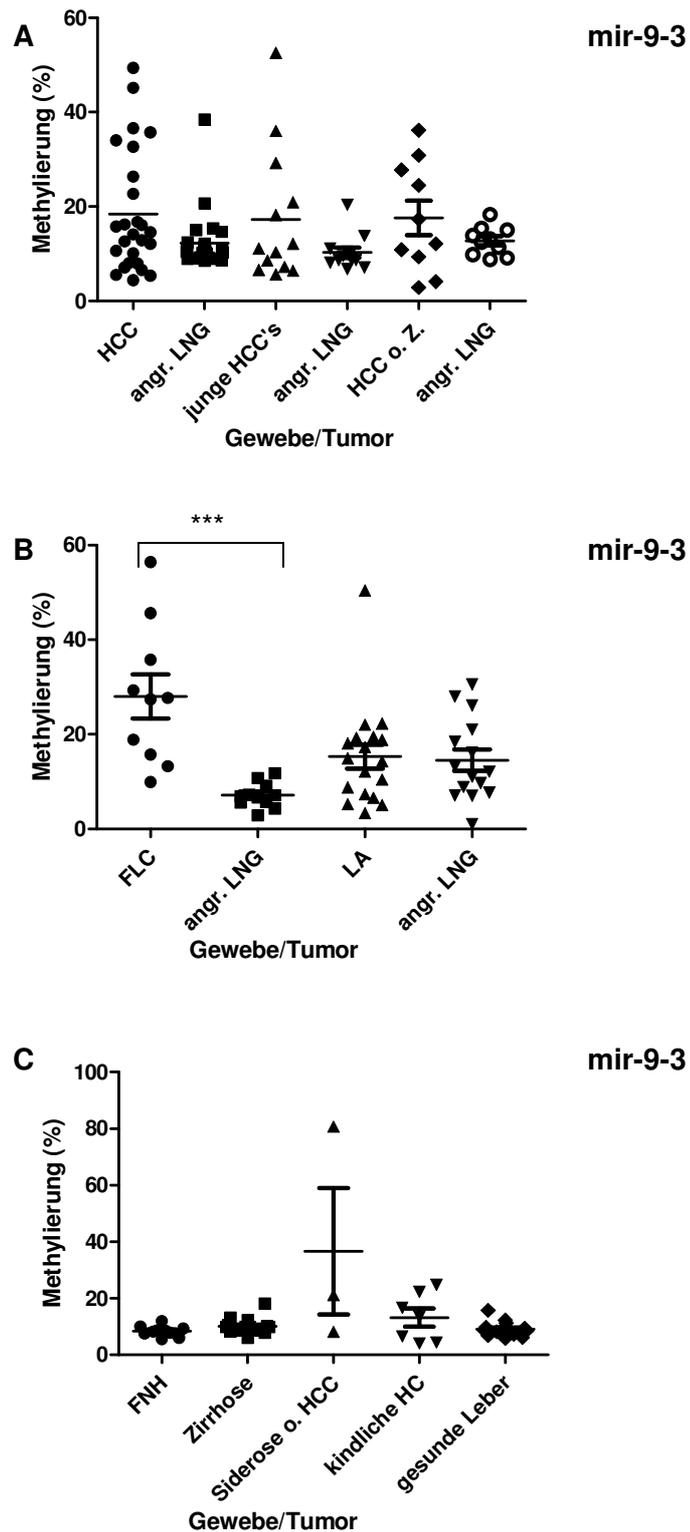


Abbildung 21 Methylierung von Hsa-mir-9-3. Methylierungswerte der microRNA-Kandidaten anhand Pyrosequenzierungsdaten und Ergebnisse des two-tailed Mann-Whitney t-Test mit 95% CI; (A), (B), (C) Hsa-mir-9-3; Darstellung des Mittelwertes mit SEM; Abkürzungen: HCC-Primärtumore (HCC), HCC-Primärtumore von Patienten <40 Jahren (junge HCC's), HCC ohne Zirrhose (HCC o. Z.), angrenzende, nicht neoplastische Normalgewebe (angr. LNG), Fibrolamelläre Karzinome (FLC), Leberadenome (LA), fokale noduläre Hyperplasien (FNH), kindliche Hämochromatosen (kindliche HC).

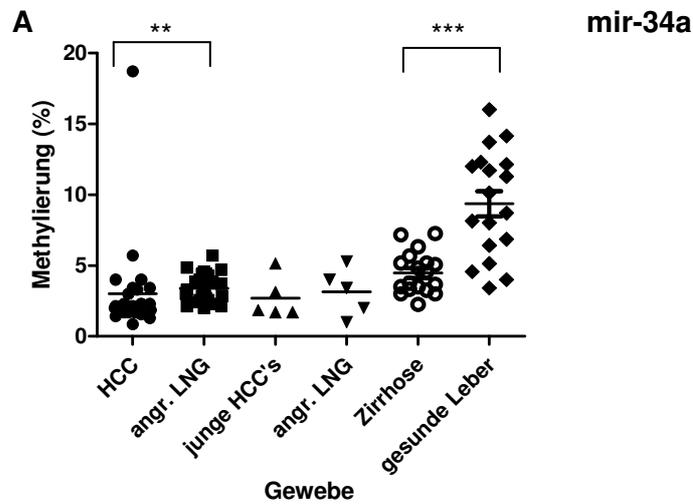


Abbildung 22 Methylierung von Hsa-mir-34a. Methylierungswerte der microRNA-Kandidaten anhand Pyrosequenzierungsdaten und Ergebnisse des two-tailed Mann-Whitney t-Test mit 95% CI; (A) Hsa-mir-34a; Darstellung des Mittelwertes mit SEM; Abkürzungen: HCC-Primärtumore (HCC), HCC-Primärtumore von Patienten <40 Jahren (junge HCC's), angrenzende, nicht neoplastische Normalgewebe (angr. LNG).

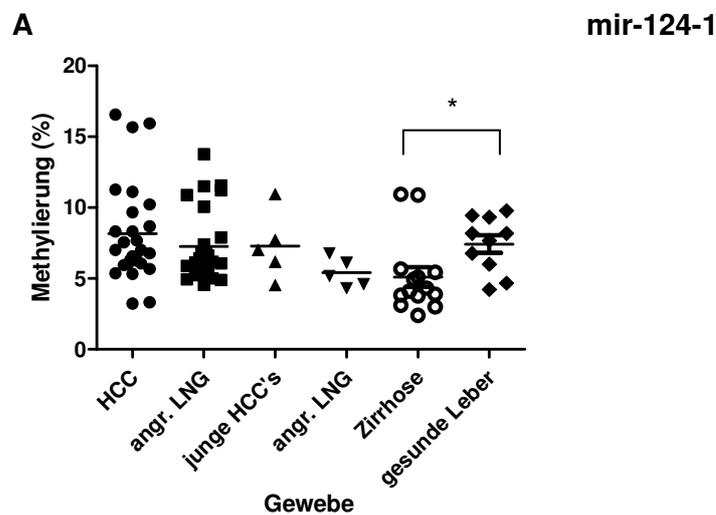


Abbildung 23 Methylierung von Hsa-mir-124-1. Methylierungswerte der microRNA-Kandidaten anhand Pyrosequenzierungsdaten und Ergebnisse des two-tailed Mann-Whitney t-Test mit 95% CI; (A) Hsa-mir-124-1; Darstellung des Mittelwertes mit SEM; Abkürzungen: HCC-Primärtumore (HCC), HCC-Primärtumore von Patienten <40 Jahren (junge HCC's), angrenzende, nicht neoplastische Normalgewebe (angr. LNG).

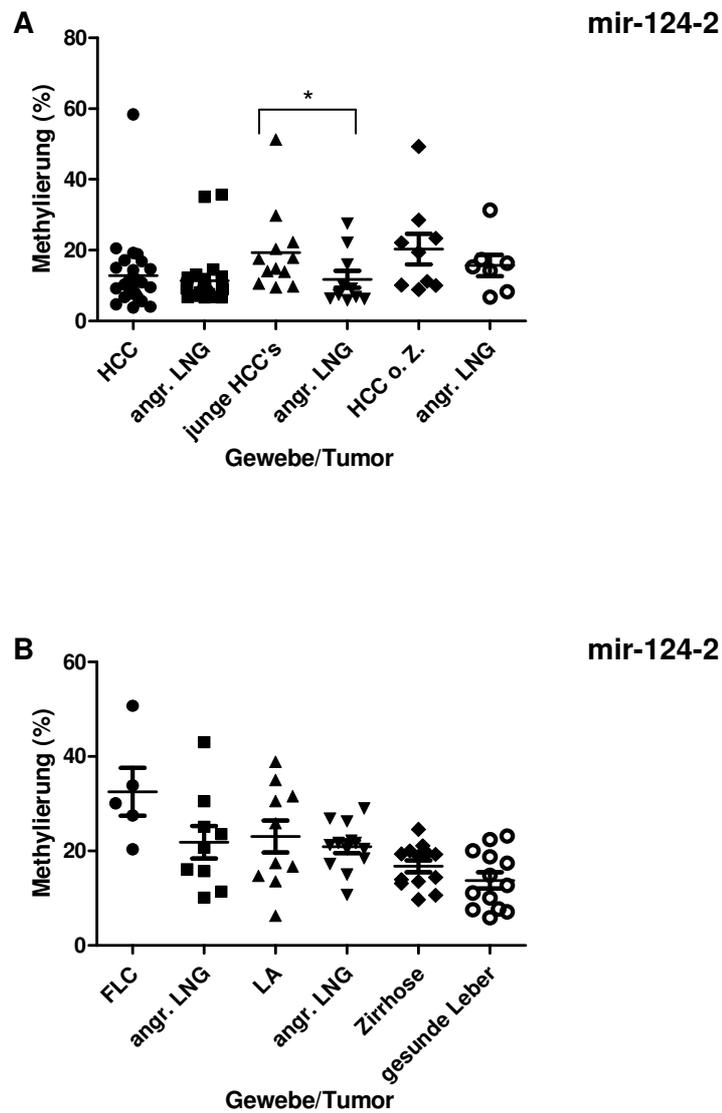


Abbildung 24 Methylierung von Hsa-mir-124-2. Methylierungswerte der microRNA-Kandidaten anhand Pyrosequenzierungsdaten und Ergebnisse des two-tailed Mann-Whitney t-Test mit 95% CI; (A), (B) Hsa-mir-124-2; Darstellung des Mittelwertes mit SEM; Abkürzungen: HCC-Primärtumore (HCC), HCC-Primärtumore von Patienten <40 Jahren (junge HCC's), HCC ohne Zirrhose (HCC o. Z.), angrenzende, nicht neoplastische Normalgewebe (anгр. LNG), Fibrolamelläre Karzinome (FLC), Leberadenome (LA).

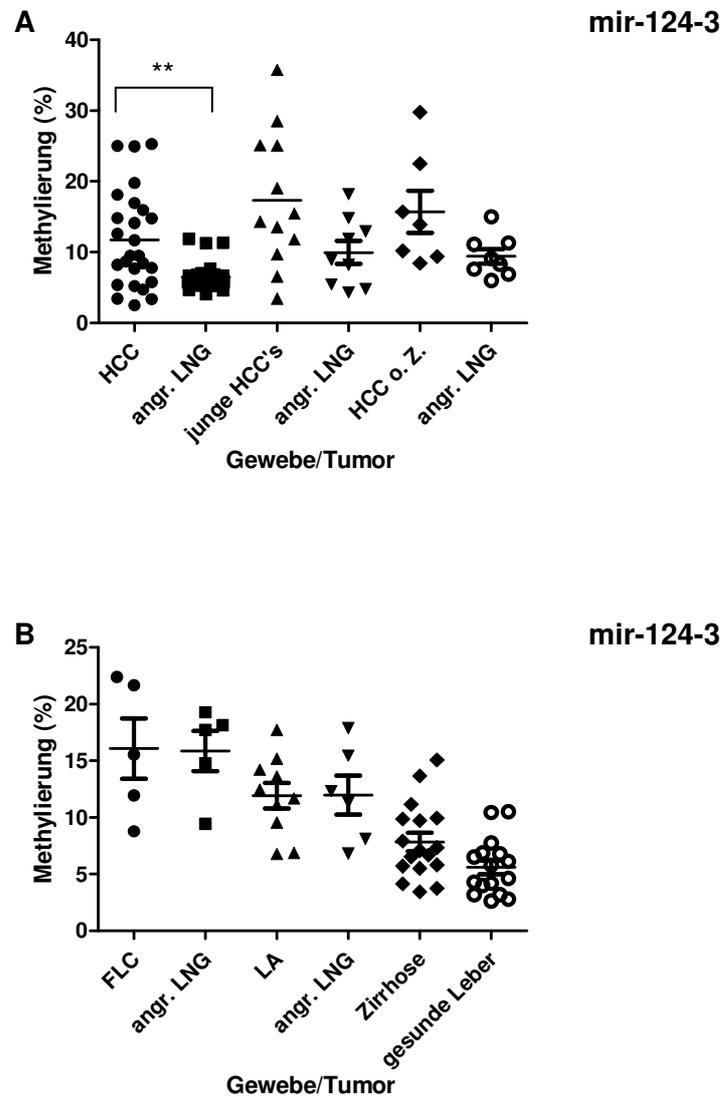


Abbildung 25 Methylierung von Hsa-mir-124-3. Methylierungswerte der microRNA-Kandidaten anhand Pyrosequenzierungsdaten und Ergebnisse des two-tailed Mann-Whitney t-Test mit 95% CI; (A), (B) Hsa-mir-124-3; Darstellung des Mittelwertes mit SEM; Abkürzungen: HCC-Primärtumore (HCC), HCC-Primärtumore von Patienten <40 Jahren (junge HCC's), HCC ohne Zirrhose (HCC o. Z.), angrenzende, nicht neoplastische Normalgewebe (angr. LNG), Fibrolamelläre Karzinome (FLC), Leberadenome (LA).

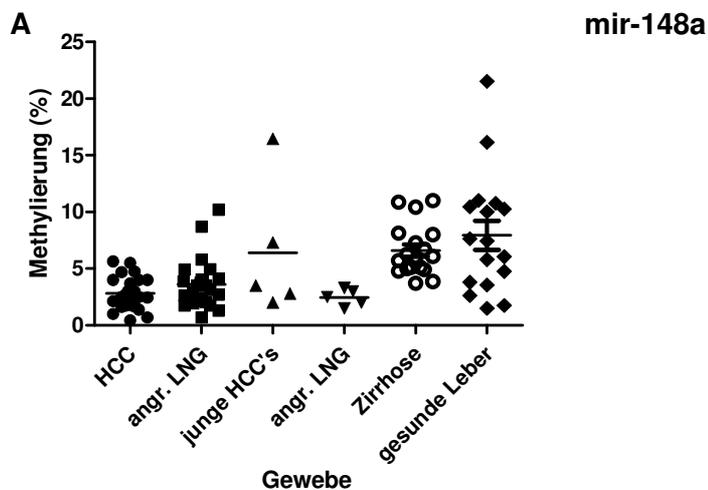


Abbildung 26 Methylierung von Hsa-mir-148a. Methylierungswerte der microRNA-Kandidaten anhand Pyrosequenzierungsdaten und Ergebnisse des two-tailed Mann-Whitney t-Test mit 95% CI; (A) Hsa-mir-148a; Darstellung des Mittelwertes mit SEM; Abkürzungen: HCC-Primärtumore (HCC), HCC-Primärtumore von Patienten <40 Jahren (junge HCC's), angrenzende, nicht neoplastische Normalgewebe (angr. LNG).

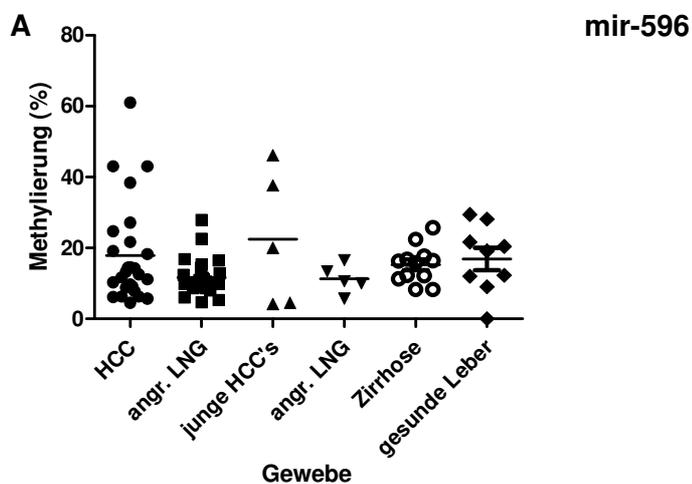


Abbildung 27 Methylierung von Hsa-mir-596. Methylierungswerte der microRNA-Kandidaten anhand Pyrosequenzierungsdaten und Ergebnisse des two-tailed Mann-Whitney t-Test mit 95% CI; (A) Hsa-mir-596; Darstellung des Mittelwertes mit SEM; Abkürzungen: HCC-Primärtumore (HCC), HCC-Primärtumore von Patienten <40 Jahren (junge HCC's), angrenzende, nicht neoplastische Normalgewebe (angr. LNG).

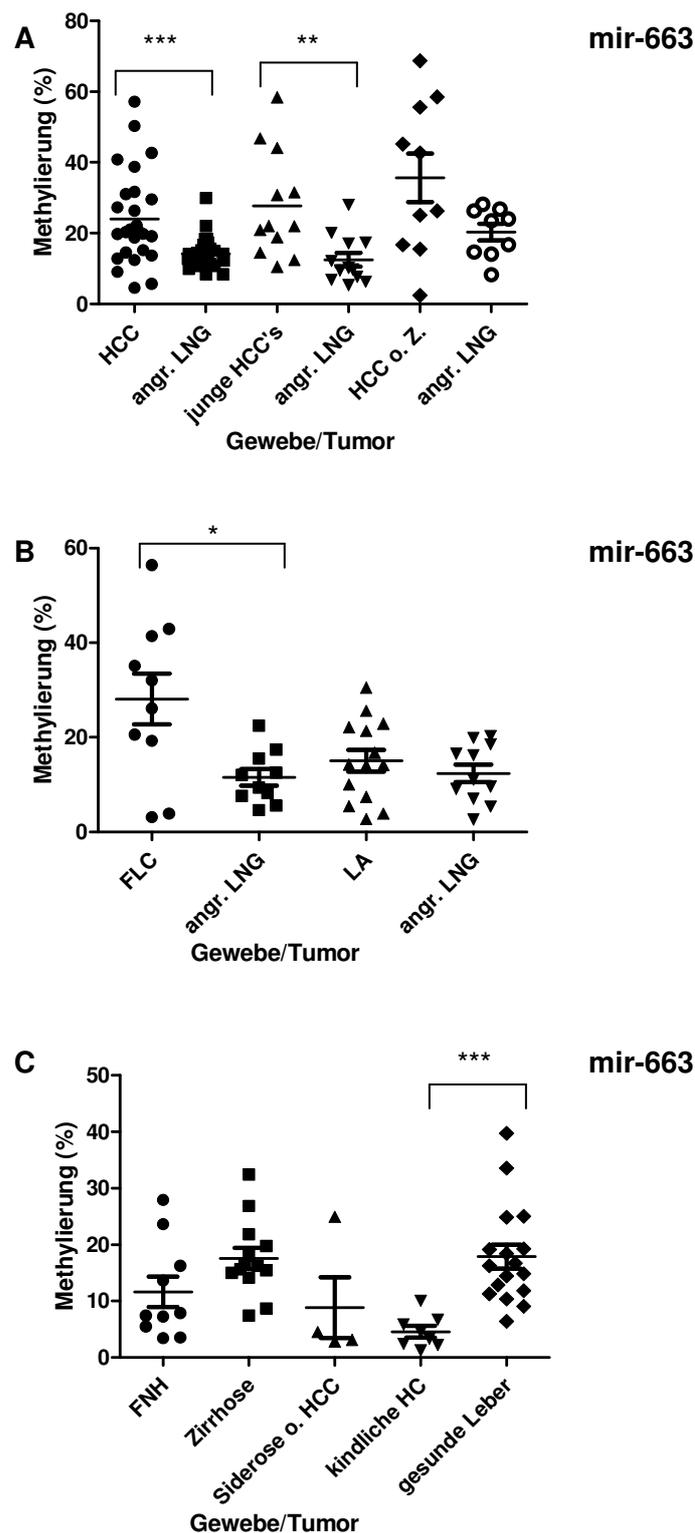


Abbildung 28 Methylierung von Hsa-mir-663. Methylierungswerte der microRNA-Kandidaten anhand Pyrosequenzierungsdaten und Ergebnisse des two-tailed Mann-Whitney t-Test mit 95% CI; (A), (B), (C) Hsa-mir-663; Darstellung des Mittelwertes mit SEM; Abkürzungen: HCC-Primärtumore (HCC), HCC-Primärtumore von Patienten <40 Jahren (junge HCC's), HCC ohne Zirrhose (HCC o. Z.), angrenzende, nicht neoplastische Normalgewebe (angr. LNG), Fibrolamelläre Karzinome (FLC), Leberadenome (LA), fokale noduläre Hyperplasien (FNH), kindliche Hämochromatosen (kindliche HC).

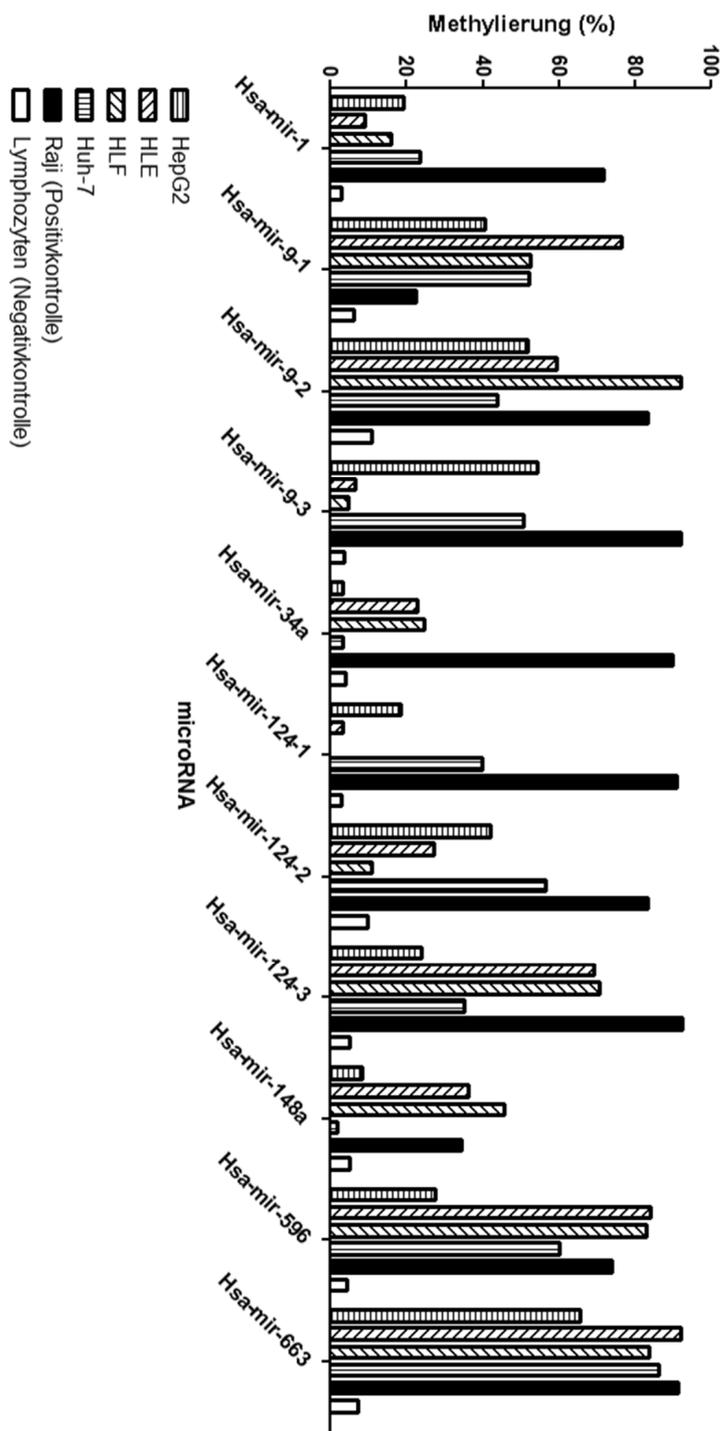


Abbildung 29 Methylierung der microRNA-Kandidaten in HCC-Zelllinien. Darstellung der durchschnittlichen Methylierung in den HCC-Zelllinien Huh-7, HLE, HLE und HepG2 sowie in Raji und Lymphozyten (Kontrollen).

Anhand dieser Daten konnte eine signifikante Hypermethylierung in den Tumorproben von Hsa-mir-1-1 (HCC's), Hsa-mir-9-1 (HCC's und FLC's), Hsa-mir-9-2 (FLC's), Hsa-

mir-9-3 (FLC's), Hsa-mir-124-2 (HCC's), Hsa-mir-124-3 (HCC's) und Hsa-mir-663 (HCC's und FLC's) gezeigt werden.

Eine signifikante Erhöhung der Methylierung in nicht-neoplastischem Gewebe war bei der microRNA Hsa-mir-34a (angr. LNG's, gesunde Leber) zu beobachten, die aber nur sehr gering und somit nicht relevant war.

Es konnten somit in 7/11 (64%) microRNAs statistisch signifikante Hypermethylierungen in den untersuchten Tumorproben festgestellt werden.

Die Untersuchung in HCC-Zelllinien zeigte ein inhomogenes Bild der Methylierung, die microRNA-Familie Hsa-mir-9 (9/12 HCC-ZL, 75%) sowie Hsa-mir-596 (3/4 HCC-ZL, 75%) und Hsa-mir-663 (4/4 HCC-ZL, 100%) sind jedoch sehr häufig in HCC-Zelllinien überdurchschnittlich hoch (\bar{x} =41%) methyliert. Die microRNA-Familie Hsa-mir-124 (4/12 HCC-ZL, 33%) ist hingegen in HCC-Zelllinien häufig überdurchschnittlich hoch methyliert. Auffällig ist, dass alle microRNAs in gesunden Lymphozyten nicht oder nur sehr schwach methyliert sind.

4.2.1.4 Statistische Analyse der paarweisen Tumor- und angrenzenden, nicht-neoplastischem Gewebeproben

Da im vorherigen Abschnitt nur die Mittelwerte aller Proben betrachtet worden sind, sollte die statistische Signifikanzanalyse auf die Methylierungsdaten individueller Proben ausgedehnt werden, da durch die vorangegangene Analyse keine individuellen Methylierungsunterschiede zwischen Tumor und angrenzendem Normalgewebe berücksichtigt werden konnten. Gleichzeitig sollte auch die Hypermethylierung stringenter definiert und mit einem Schwellenwert versehen werden. Als Schwellenwert wurde eine mittlere Methylierung von 10% gewählt, was der gemessenen Hintergrundmethylierung von unmethylierten Proben bei etwa 5% entspricht, zu der eine Varianz von 5%-Punkten addiert wurde. Die Hypermethylierung ist nach folgendem Schema berechnet worden:

Wenn die mittlere Methylierung im Tumor $>10\%$ ist und mehr als der 1,5x Methylierung des Normalgewebes entspricht, so ist eine Probe hypermethyliert. Im entgegen gesetzten Fall gilt: Wenn die mittlere Methylierung im Normalgewebe $>10\%$ ist und mehr als der 1,5x Methylierung des Tumors entspricht, so ist eine Probe im Normalgewebe hypermethyliert.

Die statistische Signifikanz der gemessenen Hypermethylierung wurde mit einer 2-Way ANOVA und Bonferroni-Posttest bestimmt, um die Signifikanz der Methylierung im jeweiligen Gewebe (Tumor oder Normalgewebe; Faktor 1) der individuellen Fälle (Faktor 2) ermitteln zu können. Die Schwellenwerte lagen bei: $p > 0,05 = \text{ns}$, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$ und $p < 0,001 = ***$.

Die Ergebnisse dieser Analysen sind wiederum in einer Tabelle zusammengefasst worden, in der neben der untersuchten microRNA, der Fallnummer und der Gewebe- bzw. Tumorart die differentielle Methylierung der Proben sowie die statistische Signifikanz aufgeführt ist (Abbildung 30, Abbildung 31 und Abbildung 32). War die Methylierung im Tumor stärker als im LNG, so wurde dies mit einem schwarzen Kästchen markiert. Wenn das LNG stärker als der Tumor methyliert war, wurde dies mit einem dunkelgrauen Kästchen angezeigt. Bei gleich starker Methylierung wurden beide Kästchen weiß gelassen. Nicht quantifizierbare Messdaten wurden als rotes Kästchen markiert.

Nach der Pyrosequenzierung aller paarigen Proben zeigte sich, dass die berechnete Hypermethylierung eines Teils der Proben nicht signifikant war. Diese Werte wurden für die finale Auswertung nicht mehr berücksichtigt.

Eine häufig auftretende, signifikante Hypermethylierung in den untersuchten Tumoren war bei den microRNAs Hsa-mir-1-1 und Hsa-mir-9-1 zu verzeichnen. Gelegentlich auftretende, signifikante Hypermethylierungen der Tumoren war bei den microRNAs Hsa-mir-9-2, Hsa-mir-9-3, Hsa-mir-124-3, Hsa-mir-596 und Hsa-mir-663 zu verzeichnen. Bei den microRNAs Hsa-mir-34a, Hsa-mir-124-1, Hsa-mir-124-2 und Hsa-mir-148a traten signifikante Hypermethylierungen nur selten auf.

Um die aus dieser Auswertung hervorgegangenen Kandidaten zu bestätigen, wurde die Methylierung aller microRNAs in mehreren Kontrollgeweben (FNH's, Zirrhose, Siderose ohne HCC mit HFE-Mutation, kindliche HC und gesunde Leber) statistisch auf Hypermethylierung überprüft.

microRNA	HCC und angr. LNG	miR-1-1 HCC	LNG	miR-9-1 HCC	LNG	miR-9-2 HCC	LNG	miR-9-3 HCC	LNG	miR-34a HCC	LNG	miR-124-1 HCC	LNG	miR-124-2 HCC	LNG	miR-124-3 HCC	LNG	miR-148a HCC	LNG	miR-596 HCC	LNG	miR-663 HCC	LNG
HCC1		**		***																ns		***	
HCC2				**																ns			ns
HCC3																							
HCC4		ns		*																ns		ns	
HCC6		***																					
HCC7																							
HCC8																							
HCC9																							
HCC10				ns																ns			
HCC12																							
HCC13																							
HCC14																							
HCC15		**		**																			
HCC16			ns																				
HCC17																							
HCC18																							
HCC19					ns																		
HCC20																							
HCC21				ns																			
HCC23				***																			
HCC26																							
HCC27																							
HCC28				ns																			
HCC29				ns																			
HCC30				*																			
HCC31				ns																			

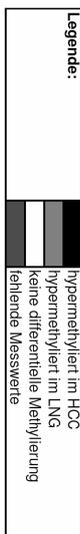
Legende:


Abbildung 30 Methylierungsgrad der microRNA-Kandidaten der einzelnen Fälle. Methylierung von 26 Paaren HCC-Primärtumoren mit angrenzendem, nicht-neoplastischem Lebergewebe; Ergebnisse einer 2-Way ANOVA mit Bonferroni-Posttest; $p > 0,05 = ns$ (nicht signifikant), $p < 0,05 = *$ (schwach signifikant), $p < 0,01 = **$ (signifikant), $p < 0,001 = ***$ (hoch signifikant).

microRNA	HCC s (<40 Jahre)	HCC ohne Zirrhose	miR-1-1 HCC LNG	miR-9-1 HCC LNG	miR-9-2 HCC LNG	miR-9-3 HCC LNG	miR-34a HCC LNG	miR-124-1 HCC LNG	miR-124-2 HCC LNG	miR-124-3 HCC LNG	miR-148a HCC LNG	miR-596 HCC LNG	miR-663 HCC LNG
HCC3													
HCC1													
HCC2													
HCC24													
HCC25													
HCC32													
HCC33													
HCC34													
HCC35													
HCC36													
HCC37													
HCC38													
HCC39													
HCC ohne Zirrhose													
HCC40													
HCC41													
HCC42													
HCC43													
HCC44													
HCC45													
HCC46													
HCC47													
HCC48													
HCC49													

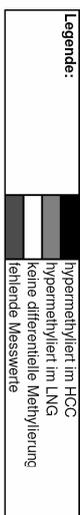
Legende:

 Hypomethyliert im HCC
 keine differentielle Methylierung
 fehlende Messwerte

Abbildung 31 Methylierungsgrad der microRNA-Kandidaten der einzelnen Fälle. Methylierung von 13 Paaren HCC-Primärtumoren mit angrenzendem, nicht-neoplastischem Lebergewebe von Patienten <40Jahre und 10 Paaren HCC-Primärtumoren mit angrenzendem, nicht-neoplastischem Lebergewebe von Patienten ohne Zirrhose; Ergebnisse einer 2-Way ANOVA mit Bonferroni-Posttest; $p>0,05= ns$ (nicht signifikant), $p<0,05= *$ (schwach signifikant), $p<0,01= **$ (signifikant), $p<0,001= ***$ (hoch signifikant).

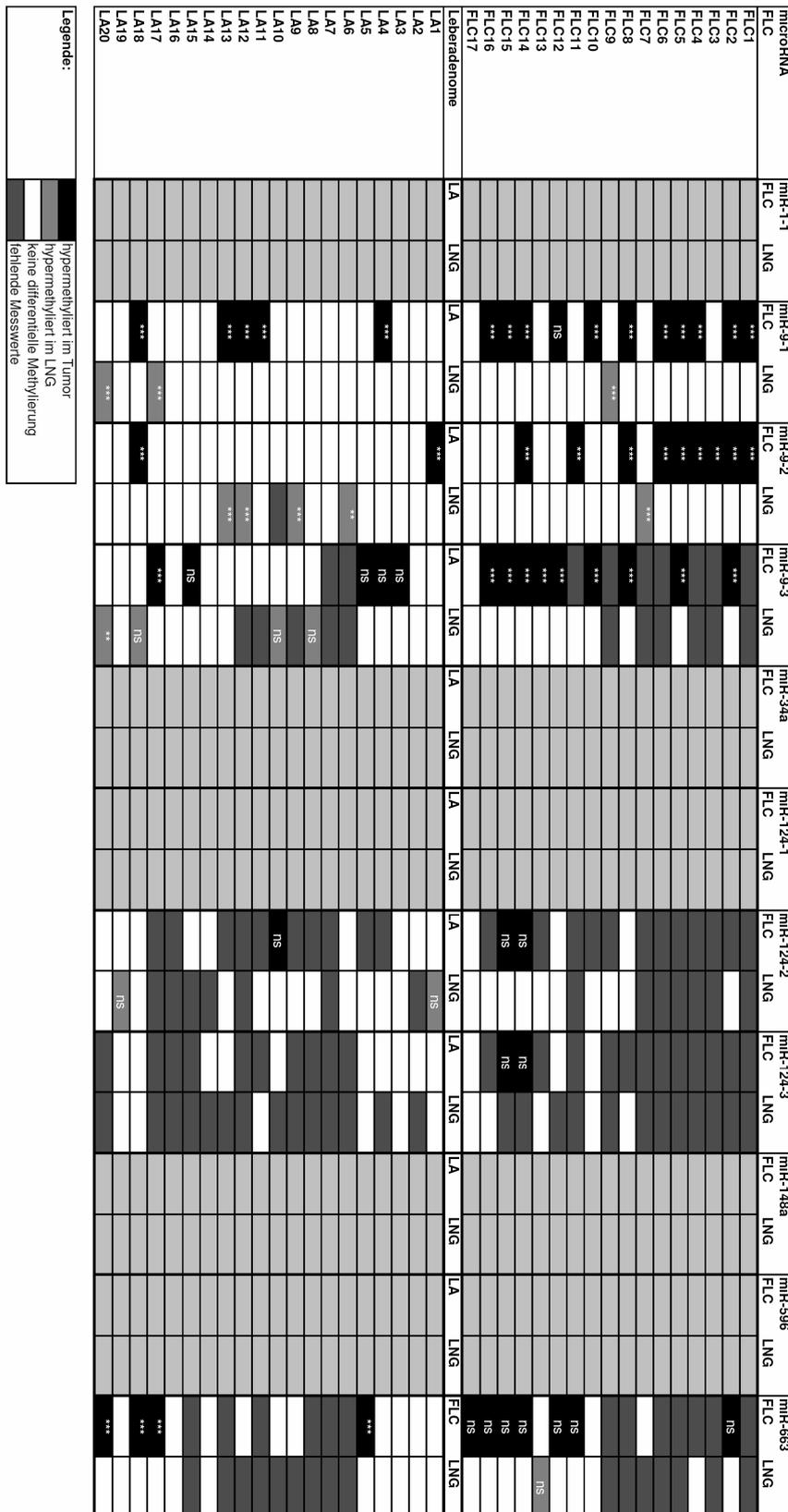


Abbildung 32 Methylierungsgrad der microRNA-Kandidaten der einzelnen Fälle. Methylierung von 17 Paaren FLC-Primärtumoren mit angrenzendem, nicht-neoplastischem Lebergewebe und 20 Paaren LA-Primärtumoren mit angrenzendem, nicht-neoplastischem Lebergewebe; Ergebnisse einer 2-Way ANOVA mit Bonferroni-Posttest; $p > 0,05 = ns$ (nicht signifikant), $p < 0,05 = *$ (schwach signifikant), $p < 0,01 = **$ (signifikant), $p < 0,001 = ***$ (hoch signifikant).

4.2.1.5 Statistische Analyse der einzelnen nicht-neoplastischem Gewebeproben

Im Folgenden sind die Kontrollgruppen ebenfalls mit dieser Methode analysiert worden, um hypermethylierte Fälle in nicht-neoplastischen Kohorten zu entdecken. In diesen Gruppen waren nur einzelne Proben verfügbar, da keine Unterteilung in Tumor und umgebendes Gewebe erfolgen konnte.

Bei den Analysen der unpaarigen Proben musste die Formel zur Berechnung der Hypermethylierung angepasst werden: Wenn die Methylierung einer Probe >10% ist und mehr als der 1,5x Methylierung des Mittelwerts der jeweiligen Gruppe entspricht, dann wurde diese Probe als hypermethyliert bezeichnet.

	miR-1-1	miR-9-1	miR-9-2	miR-9-3	miR-34a	miR-124-1	miR-124-2	miR-124-3	miR-148a	miR-596	miR-663
FNH											
FNH1											
FNH2											ns
FNH3											
FNH4											ns
FNH5											
FNH6											
FNH7											
FNH8											
FNH9											
FNH10											
Zirrhose											
CIR1								ns	ns		
CIR2											
CIR3											
CIR4											
CIR5						ns					
CIR6				**							
CIR7											
CIR8	ns										
CIR9										ns	
CIR10											ns
CIR11											
CIR12											
CIR13	ns										ns
CIR14		ns						ns	ns		
CIR15						ns			ns		
CIR16											
CIR17											
CIR18											
Siderose o. HCC m. HFE-Mut.											
HCHFE1											
HCHFE2											
HCHFE3											
HCHFE4		ns		ns							*
HCHFE5		ns									
HCHFE6											
HCHFE7			ns								
HCHFE8											
HCHFE9											
HCHFE10											

Legende:	■ hypermethyliert
	■ keine differentielle Methylierung
	■ fehlende Messwerte

Abbildung 33 Methylierungsgrad der microRNA-Kandidaten der einzelnen Fälle. Methylierung von 10 FNH-Fällen, 18 Zirrhose-Fällen und 10 Fällen mit Siderose ohne HCC mit HFE-Mutation; Ergebnisse des Grubb's Outlier Test; $p > 0,05 =$ ns (nicht signifikant), $p < 0,05 =$ * (schwach signifikant), $p < 0,01 =$ ** (signifikant), $p < 0,001 =$ *** (hoch signifikant).

Bei der Berechnung der statistischen Signifikanz musste ein anderer Test verwendet werden, da die Signifikanzen einzelner Werte aus einem Stichprobenumfang nur eines Gewebes nicht mit einer ANOVA oder einem t-Test in Graphpad Prism berechnet werden konnten. Es wurde Grubb's Outlier Test mit $\alpha = 0,05$ verwendet, um Ausreißer in

den untersuchten Gruppen zu finden und deren Signifikanz zu bestimmen. Die Schwellenwerte lagen bei: $p > 0,05$ ns, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ** $p < 0,001$ ***.

kindl. HC	miR-1-1	miR-9-1	miR-9-2	miR-9-3	miR-34a	miR-124-1	miR-124-2	miR-124-3	miR-148a	miR-596	miR-663
HC1											
HC2				ns							
HC3		ns									
HC4			ns								
HC5											
HC6											ns
HC7											
HC8				ns							
HC9											
HC10											
gesunde Leber	miR-1-1	miR-9-1	miR-9-2	miR-9-3	miR-34a	miR-124-1	miR-124-2	miR-124-3	miR-148a	miR-596	miR-663
LE1		ns			ns				ns		
LE2											
LE3											
LE4											ns
LE5								ns			
LE6											
LE7											
LE8				*							
LE9		ns						ns	ns		
LE10					ns					ns	
LE11											
LE12							ns				
LE13											
LE14	*	ns									ns
LE15											
LE16	ns									ns	
LE17											
LE18							ns				
LE19											
LE20											

Legende:	hypermethyliert
	keine differentielle Methylierung
	fehlende Messwerte

Abbildung 34 Methylierungsgrad der microRNA-Kandidaten der einzelnen Fälle. Methylierung von 10 kindlichen HC-Fällen und 20 Fällen gesunder Leber; Ergebnisse des Grubb's Outlier Test; $p > 0,05$ = ns (nicht signifikant), $p < 0,05$ = * (schwach signifikant), $p < 0,01$ = ** (signifikant), $p < 0,001$ = *** (hoch signifikant).

Insgesamt waren signifikante Hypermethylierungen von nicht-neoplastischen Gewebeproben äußerst selten. Nur bei Hsa-mir-1-1 war ein Fall gesunder Leber und bei Hsa-mir-9-3 ein Fall gesunder Leber und ein Zirrhosefall signifikant hypermethyliert. Alle anderen berechneten Hypermethylierungen waren statistisch nicht signifikant.

4.2.1.6 Semiquantitative Methylierungsanalyse (qRT-MSP)

Das erfolgreiche Etablieren eines Pyrosequenzierungsassays für die microRNAs Hsa-mir-34b/c war nicht möglich, da diese auf einer repetitiven, GC-reichen Sequenz liegen. Daher wurde die Methylierung dieser microRNAs mit einer MethyLight-PCR gemessen, die basierend auf bestehenden Primern von Roman-Gomez et al., 2008 etabliert worden ist. Anhand einer Titrationskurve der ΔC_T -Werte von unterschiedlich stark methylierten DNA-Mischungen wurden Schwellenwerte für die Methylierungsgrade ermittelt (Abbildung 35). Lag der ΔC_T -Wert des (M)-Primers zum Kontrollgen (ACTB) bei > 10 , so wurde eine Probe als unmethyliert definiert.

Ein ΔC_T -Wert von 6-10 zeigte eine schwach methylierte Probe an, wobei eine Probe mit einem ΔC_T -Wert von <6 als stark methyliert bezeichnet wurde.

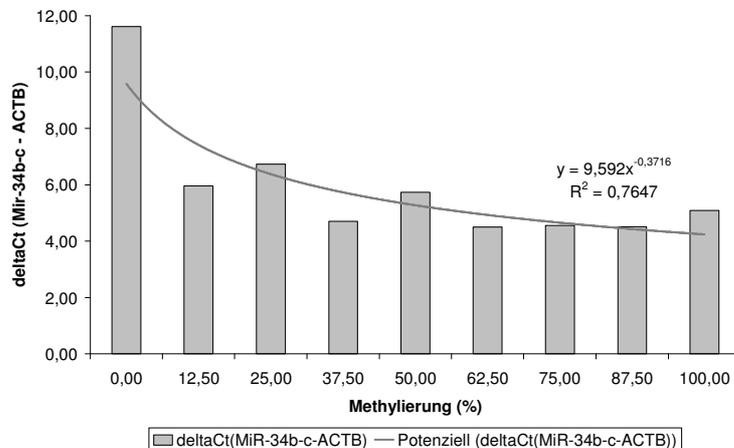


Abbildung 35 Titrationskurve der qRT-MSP (MethyLight-PCR). Die Bestimmung des Methylierungsgrades erfolgte mittels ΔC_T -Wert (mir-34b/c - ACTB).

HCC und angr. LNG	HCC	LNG	HCC ohne Zirrhose	HCC	LNG	Leberadenome	LA	LNG	Zirrhose
HCC1			HCC40			LA1			CIR1
HCC2			HCC41			LA2			CIR2
HCC3			HCC42			LA3			CIR3
HCC4			HCC43			LA4			CIR4
HCC6			HCC44			LA5			CIR5
HCC7			HCC45			LA6			CIR6
HCC8			HCC46			LA7			CIR7
HCC9			HCC47			LA8			CIR8
HCC10			HCC48			LA9			CIR9
HCC12			HCC49			LA10			CIR10
HCC13			FLC	FLC	LNG	LA11			CIR11
HCC14			FLC1			LA12			CIR12
HCC15			FLC2			LA13			CIR13
HCC16			FLC3			LA14			CIR14
HCC17			FLC4			LA15			CIR15
HCC18			FLC5			LA16			CIR16
HCC19			FLC6			LA17			CIR17
HCC20			FLC7			LA18			CIR18
HCC21			FLC8			LA19			CIR19
HCC23			FLC9			LA20			CIR20
HCC26			FLC10			LA20			gesunde Leber
HCC27			FLC11			LA20			LE1
HCC28			FLC12			LA20			LE2
HCC29			FLC13			LA20			LE3
HCC30			FLC14			LA20			LE4
HCC31			FLC15			LA20			LE5
junge HCC's (<40 Jahre)	HCC	LNG	FLC16			LA20			LE6
HCC5			FLC17			LA20			LE7
HCC11			FNH			LA20			LE8
HCC22			FNH1			LA20			LE9
HCC24			FNH2			LA20			LE10
HCC25			FNH3			LA20			LE11
HCC32			FNH4			LA20			LE12
HCC33			FNH5			LA20			LE13
HCC34			FNH6			LA20			LE14
HCC35			FNH7			LA20			LE15
HCC36			FNH8			LA20			LE16
HCC37			FNH9			LA20			LE17
HCC38			FNH10			LA20			LE18
HCC39						LA20			LE19
						LA20			LE20
						LA20			Zelllinien und Kontrolle
						LA20			Hüh-7
						LA20			HLE
						LA20			HLF
						LA20			HepG2
						LA20			Lympho

Legende:
 hypermethyliert im Tumor
 hypermethyliert im LNG
 keine differentielle Methylierung
 fehlende Messwerte

Abbildung 36 qRT-MSP von Hsa-mir-34b/c mit allen Kohorten. Darstellung der ΔC_T -Werte anhand der Titrationskurve als qualitative Signale.

Um ein umfassendes Bild der Methylierung von Hsa-mir-34b/c zu erhalten, sind alle Proben aller Kohorten mit einer MethyLight-PCR untersucht worden. Die Methylierungsdaten der einzelnen Proben wurden in Abbildung 36 zusammengefasst.

Bei stärkerer Methylierung im Tumor als im LNG wurde dies mit einem schwarzen Kästchen markiert. War das LNG stärker als der Tumor methyliert, wurde dies mit einem dunkelgrauen Kästchen angezeigt. Bei gleich starker Methylierung wurden beide Kästchen weiß gelassen.

Auffällig hierbei ist eine häufig auftretende Hypermethylierung im HCC (9/26 Fällen; 34%), wobei die Häufigkeit in jungen HCC-Fällen auf 3/13; 23% abfällt. Drei der vier Zelllinien, HLE, HLF und HepG2 waren ebenfalls hypermethyliert. Eine gelegentliche Hypermethylierung wurde in HCC's ohne Zirrhose (30%) beobachtet, in Leberadenomen liegt diese bei 20%. In allen anderen Geweben ist eine Hypermethylierung eher selten.

4.2.1.7 Zusammenfassung der Methylierungsanalysen

Um die vorangegangenen Untersuchungen abschließend auszuwerten, wurden die wichtigsten Ergebnisse noch einmal tabellarisch zusammengefasst.

In Tabelle 53 sind die Signifikanzen der Methylierungsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe sowie den untersuchten Kontrollgeweben dargestellt. Hierbei zeigte sich eine signifikante Hypermethylierung in den analysierten Tumoren der microRNAs Hsa-mir-1, Hsa-mir-9-1, Hsa-mir-9-3 und Hsa-mir-663. Signifikante Hypermethylierungen in den Kontrollgeweben wurden bei den microRNAs Hsa-mir-124-1 und Hsa-mir-663 beobachtet.

Darauf folgend wurde eine quantitative Betrachtung der signifikant hypermethylierten Einzelfälle in Tabelle 54 vorgenommen. Es zeigte sich, dass die microRNAs Hsa-mir-1, Hsa-mir-9-1, Hsa-mir-9-3 und Hsa-mir-663 die meisten hypermethylierten Tumorfälle aufwiesen. Bei der Betrachtung der Kontrollgruppen fiel nur Hsa-mir-34b/c mit gelegentlich auftretenden Hypermethylierungen auf, in allen anderen microRNAs war dies nur selten oder gar nicht der Fall. Hierzu ist jedoch anzumerken, dass die Signifikanzen bei Hsa-mir-34b/c nicht berechnet werden konnten, da die Daten nur semiquantitativer Art sind.

microRNA	HCC+LNG >40 Jahre	HCC+LNG <40 Jahre	HCC ohne Zirrhose+LNG	FLC+LNG	LA+LNG	ø Signifikanz
Anzahl (n)	26	13 (†=5)	10	17	20	in Tumoren
Hsa-mir-1-1	*	**†	n/a	n/a	n/a	**
Hsa-mir-9-1	***	**	**	**	ns	**
Hsa-mir-9-2	ns	ns	ns	**	ns	ns
Hsa-mir-9-3	ns	ns	ns	***	ns	*
Hsa-mir-34a	**††	ns†	n/a	n/a	n/a	*††
Hsa-mir-124-1	ns	ns†	n/a	n/a	n/a	ns
Hsa-mir-124-2	ns	*	ns	ns	ns	ns
Hsa-mir-124-3	**	ns	ns	ns	ns	ns
Hsa-mir-148a	ns	ns†	n/a	n/a	n/a	ns
Hsa-mir-596	ns	ns†	n/a	n/a	n/a	ns
Hsa-mir-663	***	**	ns	*	ns	*

microRNA	FNH	Zirrhose	Siderose ohne HCC	kindliche HC	gesunde Leber	ø Signifikanz
Anzahl (n)	10	18	10	10	20	in Geweben
Hsa-mir-1-1	n/a	ns	n/a	n/a	ns	ns
Hsa-mir-9-1		*	ns		ns	ns
Hsa-mir-9-2		ns	ns		*	ns
Hsa-mir-9-3		ns	ns		ns	ns
Hsa-mir-34a	n/a	s. gesunde Leber	n/a	n/a	***††	***††
Hsa-mir-124-1	n/a	*	n/a	n/a	s. Zirrhose	*
Hsa-mir-124-2	n/a	ns	n/a	n/a	s. Zirrhose	ns
Hsa-mir-124-3	n/a	ns	n/a	n/a	s. Zirrhose	ns
Hsa-mir-148a	n/a	s. gesunde Leber	n/a	n/a	ns	ns
Hsa-mir-596	n/a	s. gesunde Leber	n/a	n/a	ns	ns
Hsa-mir-663	ns	ns	ns		***	*

Tabelle 53 Signifikanzen der differentiellen Methylierung der microRNA-Kandidaten. Untersuchung der Hypermethylierung aller Tumore und Normalgewebe der gesamten Gruppen; ††= nicht relevant.

Die Häufigkeiten der auftretenden Hypermethylierungen wurden in sehr häufig: mehr als 66,6%, häufig: mehr als 33,3%, gelegentlich: mehr als 10,0% und selten: 0%-9,9% bei individuellen Probenvergleichen eingeteilt.

Eine häufig auftretende Hypermethylierung in den untersuchten HCC-Primärtumoren war bei den microRNAs Hsa-mir-1-1, der Hsa-mir-9-Familie, Hsa-mir-34b/c, Hsa-mir-124-1, Hsa-mir-124-3, Hsa-mir-596 und Hsa-mir-663 zu verzeichnen.

Gelegentlich auftretende Hypermethylierungen der HCC-Primärtumore wurden bei den microRNAs Hsa-mir-9-2, Hsa-mir-9-3, Hsa-mir-34b/c, der Hsa-mir-124-Familie, Hsa-mir-148a und Hsa-mir-596 entdeckt.

microRNA	HCC+LNG >40 Jahre	HCC+LNG <40 Jahre	HCC ohne Zirrhose+LNG	FLC+LNG	LA+LNG	Gesamtzahl
Anzahl (n)	26	13 (†=5)	10	17	20	hypermeth. Tumore
Hsa-mir-1-1	9/26; 35%	2/5; 40%	n/a	n/a	n/a	11/31; 35%
Hsa-mir-9-1	9/26; 35%	7/13; 54%	5/10; 50%	10/17; 59%	5/20; 25%	36/86; 42%
Hsa-mir-9-2	7/26; 27%	3/13; 23%	4/10; 40%	9/17; 53%	2/20; 10%	25/86; 29%
Hsa-mir-9-3	8/26; 31%	4/13; 31%	4/10; 40%	9/17; 53%	1/20; 5%	26/86; 30%
Hsa-mir-34a	1/26; 4%	0/5; 0%	n/a	n/a	n/a	1/31; 3%
Hsa-mir-34b/c*	9/26; 35%	3/13; 23%	3/10; 30%	2/17; 12%	4/20; 20%	21/86; 24%
Hsa-mir-124-1	6/26; 42%	1/5; 20%	n/a	n/a	n/a	7/31; 23%
Hsa-mir-124-2	1/26; 4%	3/13; 23%	1/10; 10%	0/17; 0%	0/20; 0%	5/86; 6%
Hsa-mir-124-3	11/26; 42%	2/13; 15%	1/10; 10%	0/17; 0%	0/20; 0%	14/86; 16%
Hsa-mir-148a	0/26; 0%	1/5; 20%	n/a	n/a	n/a	1/31; 3%
Hsa-mir-596	5/26; 19%	2/5; 40%	n/a	n/a	n/a	7/31; 23%
Hsa-mir-663	10/26; 38%	8/13; 62%	5/10; 50%	0/17; 0%	4/20; 20%	27/86; 31%

microRNA	FNH	Zirrhose	Siderose ohne HCC	kindliche HC	gesunde Leber	Gesamtzahl
Anzahl (n)	10	18	10	10	20	hypermeth. Gewebe
Hsa-mir-1-1	n/a	0/18; 0%	n/a	n/a	1/20; 5%	1/38; 3%
Hsa-mir-9-1	0/10; 0%	0/18; 0%	0/10; 0%	0/10; 0%	0/20; 0%	0/68; 0%
Hsa-mir-9-2	0/10; 0%	0/18; 0%	0/10; 0%	0/10; 0%	0/20; 0%	0/68; 0%
Hsa-mir-9-3	0/10; 0%	1/18; 6%	0/10; 0%	0/10; 0%	1/20; 5%	2/68; 3%
Hsa-mir-34a	n/a	0/18; 0%	n/a	n/a	0/20; 0%	0/38; 0%
Hsa-mir-34b/c*	1/10; 10%	4/18; 22%	0/10; 0%	0/10; 0%	2/20; 10%	7/68; 10%
Hsa-mir-124-1	n/a	0/18; 0%	n/a	n/a	0/20; 0%	0/38; 0%
Hsa-mir-124-2	n/a	0/18; 0%	n/a	n/a	0/20; 0%	0/38; 0%
Hsa-mir-124-3	n/a	0/18; 0%	n/a	n/a	0/20; 0%	0/38; 0%
Hsa-mir-148a	n/a	0/18; 0%	n/a	n/a	0/20; 0%	0/38; 0%
Hsa-mir-596	n/a	0/18; 0%	n/a	n/a	0/20; 0%	0/38; 0%
Hsa-mir-663	0/10; 0%	0/18; 0%	1/10; 10%	0/10; 0%	0/20; 0%	1/68; 1%

*qRT-MSP-Daten: keine Signifikanzberechnung möglich

Tabelle 54 Signifikanzen der differentiellen Methylierung der microRNA-Kandidaten. Anzahl der signifikant hypermethylierten Fälle von allen Tumoren und Normalgeweben.

Eine häufig auftretenden Hypermethylierung von anderen Tumorarten wurde bei der Hsa-mir-9-Familie im FLC entdeckt. Gelegentliche Hypermethylierungen wurden außerdem bei der microRNA Hsa-mir-34b/c im FLC sowie in den microRNAs Hsa-mir-9-1, Hsa-mir-9-2, Hsa-mir-34b/c und Hsa-mir-663 in Leberadenomen gemessen.

microRNA	differentielle Methylierung (%)	Ø Signifikanz der Hypermeth. in Tumoren	Ø Signifikanz der Hypermeth. in Geweben	Gesamtzahl hypermethylierte Tumore	Gesamtzahl hypermethylierte Gewebe
Hsa-mir-1-1	4,46	**	ns	11/31; 35%	1/38; 3%
Hsa-mir-9-1	11,34	**	ns	36/86; 42%	0/68; 0%
Hsa-mir-9-2	4,38	ns	ns	25/86; 29%	0/68; 0%
Hsa-mir-9-3	6,17	*	ns	26/86; 30%	2/68; 3%
Hsa-mir-34a	-0,39	*††	***††	1/31; 3%	0/38; 0%
Hsa-mir-34b/c*	n/a	n/a	n/a	21/86; 24%	7/68; 10%
Hsa-mir-124-1	0,88	ns	*	7/31; 23%	0/38; 0%
Hsa-mir-124-2	1,41	ns	ns	5/86; 6%	0/38; 0%
Hsa-mir-124-3	5,19	ns	ns	14/86; 16%	0/38; 0%
Hsa-mir-148a	-0,79	ns	ns	1/31; 3%	0/38; 0%
Hsa-mir-596	6,12	ns	ns	7/31; 23%	0/38; 0%
Hsa-mir-663	9,85	*	*	27/86; 31%	1/68; 1%

Tabelle 55 Ermittlung der besten microRNA-Kandidaten. Betrachtung der differentiellen Methylierung im HCC (Ø Methylierung HCC - Ø Methylierung LNG), der signifikant hypermethylierten Gruppen und einzelnen Fälle sowie die Anzahl von hypermethylierten Tumor- und Gewebeproben. ††= nicht relevant.

In den untersuchten Kontrollgeweben konnten gelegentliche Hypermethylierungen bei den microRNAs Hsa-mir-34b/c (FNH, Zirrhose) und Hsa-mir-663 (Siderose ohne HCC) festgestellt werden. Bei allen anderen untersuchten Kohorten waren Hypermethylierungen in nicht-neoplastischen Geweben nur selten zu verzeichnen.

Betrachtet man die Summe aller ermittelten Kriterien (Tabelle 55), so fallen die microRNAs Hsa-mir-1, Hsa-mir-124-1, Hsa-mir-124-2, Hsa-mir-124-3, Hsa-mir-148a und Hsa-mir-596 als Kandidaten heraus, da die differentielle Methylierung von Tumoren und angrenzenden Normalgeweben zu gering ist. Die microRNAs Hsa-mir-34b/c können nicht eindeutig als Kandidaten identifiziert werden, da keine quantitativen Daten vorliegen. Die microRNA Hsa-mir-34a erwies sich als ein zu schwacher Kandidat für eine signifikante Hypomethylierung im HCC, da der gemessene Methylierungsunterschied sowie die Methylierung in gesunder Leber unterhalb des von uns definierten Schwellenwertes von 10% Methylierung lagen (vgl. Kapitel 5.1.6).

Folglich kann subsumiert werden, dass die microRNA-Familie Hsa-mir-9 und die microRNA Hsa-mir-663 die Gene mit der stärksten differentiellen, aberranten Hypermethylierung im HCC aus den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen sind.

4.2.2 Korrelationsanalysen ätiologisch relevanter Faktoren

4.2.2.1 Untersuchung von CpG-Insel Methylator Phenotypes

Um herauszufinden, ob die Hypermethylierung der untersuchten Gene verstärkt bei einem bestimmten Fall auftauchte, wurde gezielt nach so genannten CIMPs (*CpG-Island Methylator Phenotypes*) gesucht.

Zur Definition eines CIMP müssen die folgenden Kriterien erfüllt sein: Erstens muss zur Messung eine quantitative Methode, wie die Pyrosequenzierung verwendet werden. Zweitens dürfen keine Gene zur Definition des Phänotyps verwendet werden, die im angrenzenden Normalgewebe stark methyliert sind (Issa, 2004). Diese Kriterien waren bei den von uns ermittelten microRNA-Kandidaten erfüllt.

Das Auftreten eines CIMP wurde erstmals von Toyota et al. beschrieben. Dies ist in dieser Publikation als eine Gruppe von Karzinomen mit einer 3-5-fach erhöhten Häufigkeit von aberranter Methylierung bestimmter Gene definiert worden (Toyota et al., 1999). Diese Definition wurde von uns adaptiert, indem alle Fälle als CIMP markiert wurden, in denen $\geq 4/11$ (33%) der untersuchten microRNA-Gene signifikant hypermethyliert waren.

Daraufhin wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt, um signifikante Zusammenhänge zu entdecken. Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines CIMP und Zirrhose. Des Weiteren wurde die Korrelation von CIMP's und Hepatitis-B-Infektionen untersucht. Hierbei zeigte sich ebenfalls keine signifikante Korrelation (Tabelle 56).

Abschließend wurde die Verteilung von Alter und Geschlecht bei den betrachteten Fällen überprüft. Interessanterweise waren die Aufteilungen von Geschlecht und Alter bei den CIMPs, verglichen mit der gesamten Kohorte, nicht signifikant unterschiedlich, was bedeuten könnte, dass dies keine ätiologisch relevanten Faktoren sind.

4.2.2.2 Korrelation von Alter und Methylierung

Um eine altersbedingte Zunahme der Methylierung von Promotorsequenzen der untersuchten microRNAs als Ursache für die Hypermethylierung auszuschließen, wurden alle Methylierungsdaten statistisch überprüft. Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen Alter und Methylierung bei der Betrachtung von Methylierungsdaten der Tumore (ns). Eine signifikante Korrelation war nur im angrenzenden, nicht-neoplastischen Lebergewebe bei den microRNAs Hsa-mir-9-3(**) und Hsa-mir-663(*) erwartungsgemäß zu erkennen, die nicht in Zusammenhang mit aberranter Methylierung in Tumoren steht.

4.2.3 Promotoranalysen von CpG-Insel assoziierten microRNAs

Da 60% aller menschlichen Gene einen CpG-Insel assoziierten Promotor aufweisen und von einigen microRNAs, wie beispielsweise Hsa-mir-34a, bekannt ist, dass sie einen eigenen Promotor besitzen (Tarasov et al., 2007) und (Fukao et al., 2007), wurde ein Versuch unternommen, den Promotor von Hsa-mir-9-1 zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine 5'-RACE durchgeführt, um das Primärtranskript der microRNA zu bestimmen.

4.2.3.1 5'-RACE des Primärtranskripts von Hsa-mir-9-1

Im ersten Ansatz der 5'-RACE konnte ein 800bp großes PCR-Produkt in der Zelllinie HLF nachgewiesen werden, das im Folgenden kloniert und sequenziert wurde (Daten nicht aufgeführt). Die Sequenzierung zeigte jedoch nicht den erwarteten Sequenzabschnitt, sondern nur unspezifische PCR-Artefakte. Daher wurde eine zweite Analyse mit einem für GC-reiche Sequenzen optimierten Protokoll durchgeführt. Hierbei wurden die gleichen Primer wie in der ersten RACE verwendet, die Reaktionsbedingungen sind jedoch optimiert worden, sodass nun die cDNA in vorgewärmtem Puffer bei einer höheren Reaktionstemperatur (50 °C) synthetisiert wurde, um die Bildung von Sekundärstrukturen der RNA zu vermeiden. Nach der ersten Amplifikation waren keine Produkte außer den Kontrollen zu erkennen, daher wurde das PCR-Produkt mit geringer Verdünnung (1:5) in der zweiten Amplifikation eingesetzt (Abbildung 37).

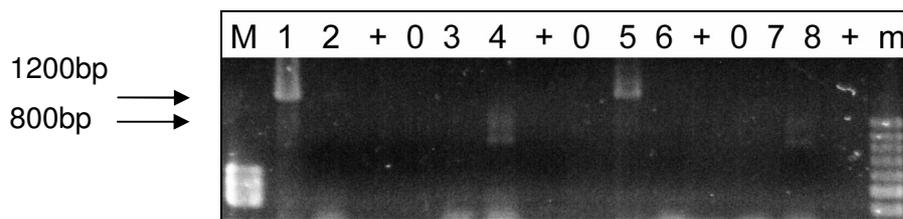


Abbildung 37 5'-RACE mir-9-1 optimiert für GC-reiche Zielsequenzen. Verwendete Primer: GSP2A und GSP3A; 1-4= GSP2A 1:1; 5-8= GSP2A 1:5; M= pBR322 DNA Marker; 1= Huh-7; 2= HLF; += PC; 0= NTC; 3= Huh-7; 4= HLF; += PC (Kontroll-RNA); 0= NTC; 5= Huh-7; 6= HLF; += PC; 0= NTC; 7= Huh-7; 8= HLF; += PC (Kontroll-RNA); 0= NTC; m= 100bp Ladder Marker.

Zu beachten ist, dass die internen Kontrollen trotz einer Verdünnung von 1:5 keine PCR-Produkte in der zweiten Amplifikation mit dem GSP3-Primer geliefert haben, was möglicherweise an einem Überschuss an GSP2-PCR-Produkt gelegen hat, welches einen inhibitorischen Effekt auf die PCR-Effizienz hatte. Daher wären diese Daten prinzipiell nicht weiter verwendet worden. Da jedoch zwei unterschiedlich große PCR-Produkte bei Huh-7 (1200bp) und HLF (800bp) vorhanden waren, wurden diese kloniert und sequenziert (Daten nicht aufgeführt). Die Sequenzierung dieser beiden Produkte zeigte erneut nur PCR-Artefakte und somit wurden neue RACE-Primer erstellt, die an anderen Positionen auf der Precursor-Sequenz der microRNA binden.

4.2.3.2 5'-RACE von Hsa-mir-9-1 mit Primern laut *First Exon Finder*-Vorhersage

Parallel zu der erneuten 5'-RACE-Planung wurde in der cDNA-Nested-PCR von Hsa-mir-9-1 ein 354bp großes PCR-Produkt amplifiziert, worauf hin neue RACE-Primer anhand der Vorhersagedaten des *UCSC Genome Browser*-basierten Programms *First Exon Finder (FEF)* erstellt wurden. Die Arbeitsgruppe um Lujambio et al. (Lujambio et al., 2008) publizierte zu diesem Zeitpunkt jedoch eigene RACE-Ergebnisse, in denen sie die Amplifikation eines 442bp großen Primärtranskripts von Hsa-mir-9-1 beschrieben (Abbildung 38). Die Primer aus dieser Publikation wurden zusammen mit den mit Hilfe von FEF erstellten Primern verwendet, um eine erneute 5'-RACE-Analyse durchzuführen.

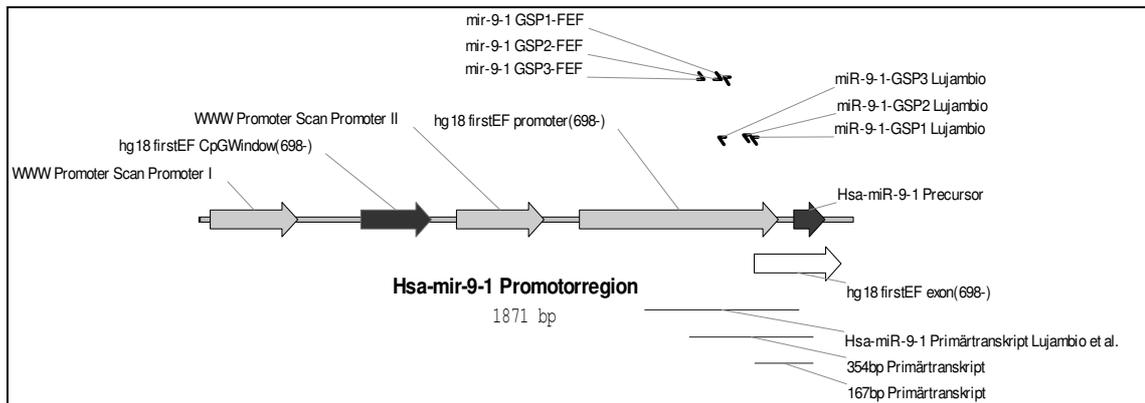


Abbildung 38 Lage der 5'-RACE-Primer und genomischer Kontext von Hsa-mir-9-1. Dargestellt sind die Lokalisation der Primer von Lujambio et al. (Lujambio et al., 2008) sowie die der Primer anhand der First Exon Finder (FEF)-Analyse.

Nach der GSP2-Amplifikation zeigte sich bei allen Primerpaaren nur ein etwa 100bp großes, unspezifisches Fragment (Daten nicht aufgeführt). Nur die interne Kontrolle lieferte das erwartete Fragment der Größe 711bp. In der zweiten Amplifikation konnten schließlich die Ergebnisse von Lujambio et al. reproduziert werden. Das GSP3-Primerpaar lieferte das 442bp-Produkt in Huh-7 (mit einigen Nebenprodukten) und HepG2.

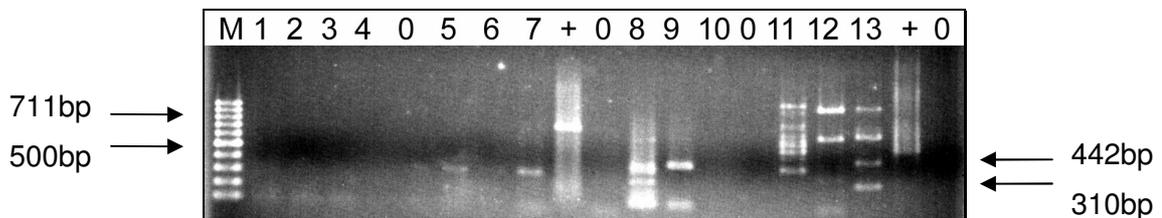


Abbildung 39 5'-RACE Hsa-mir-9-1 laut Lujambio et al. und FirstEF-Primerdesign. Verwendete Primer: 1-4= GSP2 Lujambio; 5-7= Control GSP2; 8-10= GSP3 (Lujambio et al., 2008); 11-13= Control GSP3; M= 100bp Ladder Marker, 1= Huh-7; 2= HepG2; 3-4= KPL-1; 0= NTC; 5= Huh-7; 6= HepG2; 7= KPL-1; += PC; 0= NTC; 8= Huh-7; 9= HepG2; 10= KPL-1; 11= Huh-7; 12= HepG2; 13= KPL-1; += PC; 0= NTC.

Die Kontrollprodukte der Größen 711bp (GSP2) und 500bp bzw. 310bp (GSP3) sind ebenfalls deutlich zu erkennen. Die GSP3-FEF-Primer lieferten auch in der zweiten Amplifikation kein Produkt (Daten nicht aufgeführt). Die Sequenzierung des 442bp Produktes ergab, dass zwei der fünf klonierten Fragmente aus HepG2 der von Lujambio et al. vorausgesagten Primärsequenz entsprachen (Lujambio et al., 2008).

4.2.3.3 Nested cDNA-PCR Hsa-mir-9-1

Da die ersten 5'-RACE-Analysen nicht die erwarteten Resultate lieferten, wurde eine alternative Methode zur Identifizierung des Primärtranskripts von Hsa-mir-9-1 angewendet. Durch die Amplifikation eines Fragments der Gesamt-cDNA aus dem 5'-Bereich von Hsa-mir-9-1 sollte mit geschachtelt liegenden Primerpaaren ein Teil des Primärtranskripts amplifiziert werden. Anhand von Sequenzanalysen mit Hilfe des *UCSC Genome Browsers* wurde das EST BI464980 in 5'-Richtung der muren microRNA-Sequenz von Hsa-mir-9-1 entdeckt (Abbildung 40).

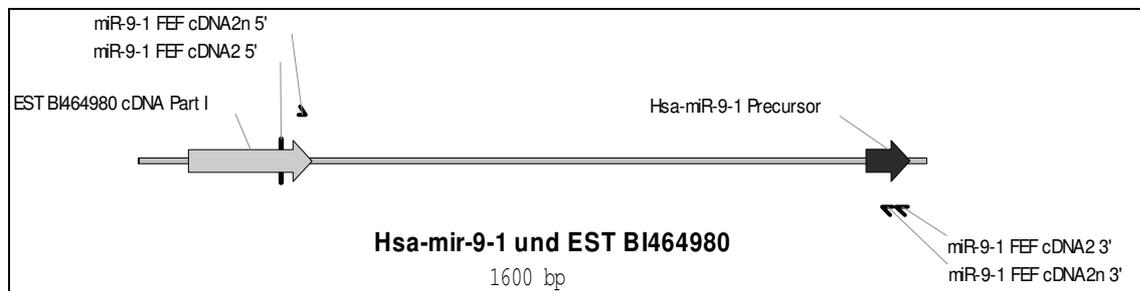


Abbildung 40 Primerlokalisierung der Nested-PCR Hsa-mir-9-1.

Im Folgenden sollte geprüft werden, ob diese beiden ein gemeinsames Primärtranskript besitzen, indem die 5'-Primer auf den EST und die 3'-Primer auf die Precursor-Sequenz der microRNA gelegt und in der Nested-PCR eingesetzt worden sind (Abbildung 41).

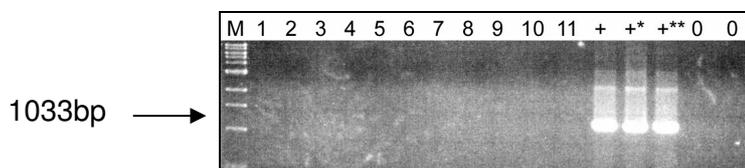


Abbildung 41 Nested-PCR von Hsa-mir-9-1 (Primärtranskript I). Amplifikation des 1033bp Primärtranskripts von Hsa-mir-9-1-cDNA 2n 5'/3'; D+= mit DNase-Verdau; D-= ohne DNase-Verdau; M= 1Kb Ladder Marker; 1-4= KPL-1, HepG2, Lymphozyten, Granulozyten (D-); 5-8= KPL-1, HepG2, Lymphozyten, Granulozyten (D-); 9-11= Huh-7, HLE, HLF (D+); +-+**= gDNA Lymphozyten(5ng/µl), Plazenta(5ng/µl), Lymphozyten (1:10); 0,0= NTC (D+), NTC (D-).

Nach erfolgter Nested-PCR wurde keine Expression des 1033bp großen Fragments beobachtet, was die Schlussfolgerung zulässt, dass sehr wahrscheinlich kein gemein-

sames Primärtranskript von Hsa-mir-9-1 und dem EST BI464980 in den untersuchten Zelllinien existiert.

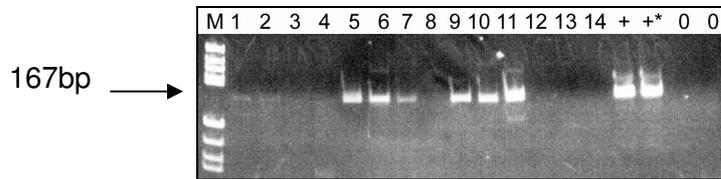


Abbildung 42 Nested-PCR von Hsa-mir-9-1 (Primärtranskript II). Amplifikation des 167bp Primärtranskripts von Hsa-mir-9-1-cDNA1 5'/3'; D+= mit DNase-Verdau; D-= ohne DNase-Verdau; M= pBR322 DNA Marker; 1-3= KPL-1 (D+); 4= KPL-1 (D-); 5-7= HepG2 (D+); 8= HepG2 (D-); 9-11= Huh-7, HLE, HLF (D+); 12-14= Huh-7, HLE, HLF (D-); ++* = PC gDNA Lymphozyten 1:10 und 1:1 (5ng/μl); 0,0= NTC (D+), NTC (D-).

Daher wurde ein minimaler Teil des Primärtranskripts anhand der mit Hilfe des *UCSC Genome Browsers* vorhergesagten putativen Promotorstrukturen (Abbildung 49) analysiert.

In dieser PCR wurde ein 167bp großes Amplifikat ermittelt (Abbildung 42), das auch in einer zweiten PCR das erwartete, 66bp große PCR-Produkt lieferte (Daten nicht aufgeführt). Daher sollte die Analyse auf ein größeres Amplifikat von 354bp Größe ausgedehnt werden, um sich so schrittweise der realen Größe des Primärtranskripts anzunähern.

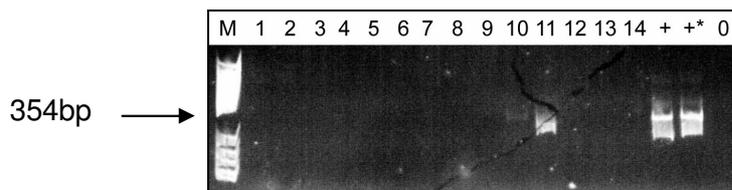


Abbildung 43 Nested-PCR von Hsa-mir-9-1 (Primärtranskript III). Amplifikation des 354bp Primärtranskripts von Hsa-mir-9-1-cDNA1 5'/cDNA3 3'; D+=mit DNase-Verdau; D-=ohne DNase-Verdau; M=pBR322 DNA Marker; 1-3= KPL-1, (D+); 4= KPL-1, (D-); 5-7= HepG2, (D+); 8= HepG2, (D-); 9-11= Huh-7, HLE, HLF (D+); 12-14= Huh-7, HLE, HLF (D-); ++* = gDNA Lymphozyten 1:10, 1:1 (5ng/μl); 0=NTC.

Die PCR des 354bp großen Primärtranskripts (Abbildung 43) zeigt eine schwache Bande in HLE und eine starke Bande in HLF. Es ist somit anzunehmen, dass das Primärtranskript von Hsa-mir-9-1 mindestens 354bp lang ist. Von diesem Fragment ausgehend wurden die neuen 5'-RACE-Primer GSP1-FEF, GSP2-FEF und GSP3-FEF erstellt, die in der letzten 5'-RACE-Analyse (Kapitel 4.2.3.2) getestet wurden.

4.2.3.4 Expressionsanalysen von CpG-Insel assoziierten microRNAs

Ziel dieser Untersuchungen war, einen Zusammenhang zwischen aberranter, tumorspezifischer Methylierung und der Expression ausgewählter microRNA-Kandidaten nachzuweisen.

4.2.3.4.1 Expression von Hsa-mir-1 in Zelllinien

Zelllinie			
CaKi-2	Cal51	HepG2	HLE
HLF	HuH-7	KPL-1	MCF-7
MDA-MB-231	MDA-MB-361	Raji	Te761
ZR-75-1			

Tabelle 57 Zelllinien der Expressionsanalyse von Hsa-mir-1.

Hsa-mir-1 wurde aufgrund der Expressionsdaten von Datta et al., 2008 als einer der microRNA-Kandidaten ausgewählt, um als erstes Testgen der Expressionsanalysen von CpG-Insel assoziierten microRNAs zu dienen. Es wurde die Expression von Hsa-mir-1 in den in Tabelle 57 dargestellten Zelllinien mit TaqMan® MicroRNA Assays von Applied Biosystems bestimmt, wobei als Kontrolle Lymphozyten-RNA verwendet wurde.

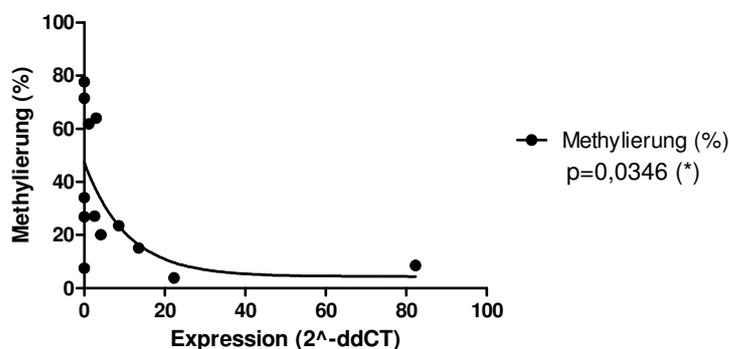


Abbildung 44 Methylierung und Expression von Hsa-mir-1 in 13 Zelllinien. Auftrag der Expression ($2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte gegen Lymphozyten) gegen die durchschnittliche Methylierung (%); Ergebnisse der Prism Correlation Analysis ($\alpha=0,05$); $p>0,05=$ ns (nicht signifikant), $p<0,05=$ * (schwach signifikant).

Anhand der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte der qRT-PCR sollte die Expression in den untersuchten Zelllinien relativ zur Kontrolle (Lymphozyten) bestimmt werden. Um Rückschlüsse auf einen regulatorischen Zusammenhang zwischen der Methylierung dieser microRNA und deren Expression ziehen zu können, wurde die durchschnittliche Methylierung (%) gegen die durchschnittlichen $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte der Zelllinien aufgetragen und eine Korrelationsanalyse durchgeführt (Abbildung 44).

Es konnte eine schwach signifikante, inverse Korrelation von Methylierung und Expression festgestellt werden, die die Hypothese bestätigt, dass eine Herunterregulierung der Expression durch eine steigende Methylierung verursacht werden kann.

4.2.3.4.2 Expression von Hsa-mir-1 in HCC und angrenzendem LNG

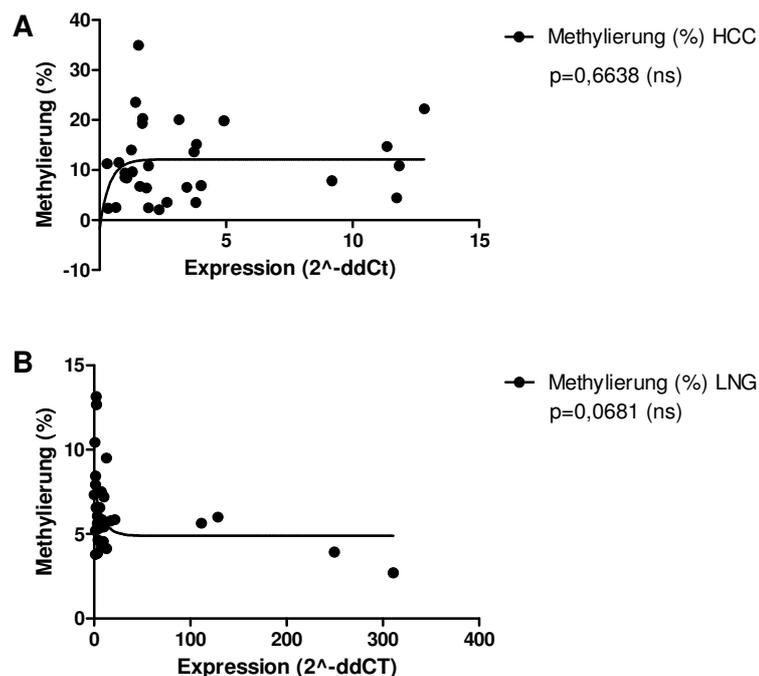


Abbildung 45 Methylierung und Expression von Hsa-mir-1 in Patientenmaterial. Untersuchung von 31 HCC-Primärtumoren (A) und angrenzendem LNG (B); Auftrag der Expression ($2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte gegen Lymphozyten) gegen die durchschnittliche Methylierung (%); Ergebnisse der Prism Correlation Analysis ($\alpha=0,05$); $p>0,05$ = ns (nicht signifikant), $p<0,05$ =* (schwach signifikant).

Im Folgenden wurde die Expression von Hsa-mir-1 auch in 31 HCC-Primärtumoren und angrenzendem, nicht-neoplastischen Lebergewebe gemessen, um die Situation *in vivo* zu prüfen, da die Lage in Zelllinien nur als Indiz der realen Umstände gewertet werden kann. Die Daten aus diesen Messungen sind in Abbildung 45 dargestellt.

Es zeigte sich weder in den HCC-Primärtumoren, noch in den angrenzenden Normalgeweben eine signifikante Korrelation von Methylierung und Expression. Daher wurden keine weiteren Expressionsanalysen von Hsa-mir-1 durchgeführt.

4.2.3.4.3 Expression von Hsa-mir-9 in Zelllinien

Analog zu den Messungen in Hsa-mir-1 wurde die Expression von Hsa-mir-9 in den Zelllinien HepG2, Huh-7, HLE und HLF gemessen. Als Kontrolle dienten ebenfalls Lymphozyten. Es wurden die C_T -Werte zur Berechnung des $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wertes verwendet und zur Korrelationsanalyse die Methylierung gegen die Expression aufgetragen.

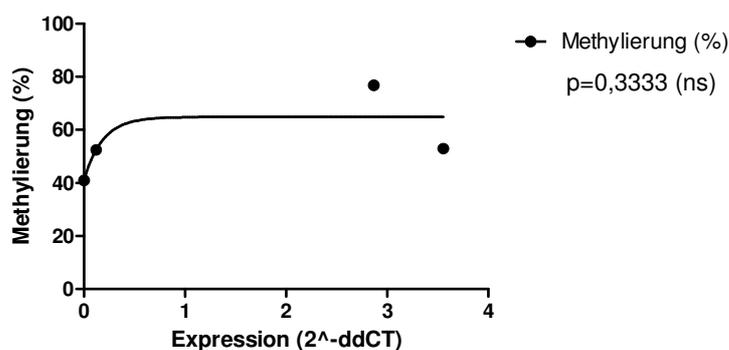


Abbildung 46 Methylierung und Expression von Hsa-mir-9 in vier Zelllinien. Auftrag der Expression ($2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte gegen Lymphozyten) gegen die durchschnittliche Methylierung (%); Ergebnisse der Prism Correlation Analysis ($\alpha=0,05$); $p>0,05=$ ns (nicht signifikant), $p<0,05=$ * (schwach signifikant).

Hierbei ließ sich keine signifikante Korrelation zwischen Methylierung und Expression nachweisen. Um die Expression von Hsa-mir-9 dennoch *in vivo* zu überprüfen, wurden im Folgenden HCC-Primärtumore und nicht-neoplastisches Lebergewebe untersucht.

4.2.3.4.4 Expression von Hsa-mir-9 in HCC und angrenzendem LNG

Es wurden die zehn am stärksten methylierten HCC's und die fünf am schwächsten methylierten LNG's ausgewählt. Beide Gruppen sind gemeinsam in der Abbildung 47 dargestellt, da in diesem Fall keine Tumor/Normalgewebe-Paare verwendet worden sind, sondern individuelle Proben, die nur nach ihrem Methylierungsgrad ausgewählt wurden.

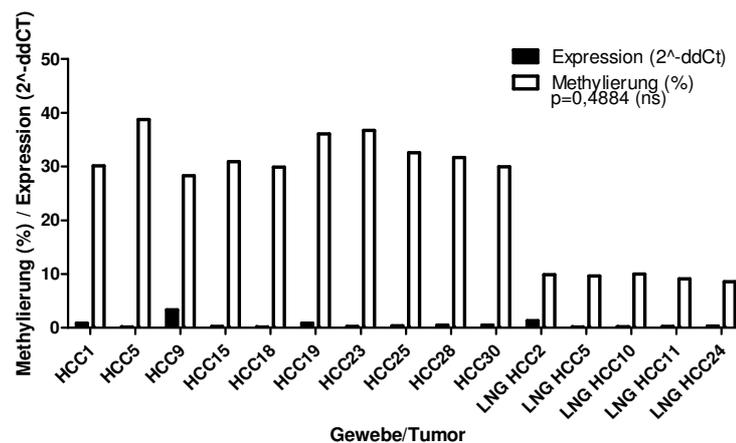


Abbildung 47 Methylierung und Expression von Hsa-mir-9 in Patientenmaterial. Untersuchung von 10 stark methylierten HCC-Primärtumoren und 5 schwach methylierten nicht-neoplastischen Lebergeweben; Auftrag der Expression ($2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte gegen Lymphozyten) und der durchschnittlichen Methylierung (%); Ergebnisse der 2-Way ANOVA mit Bonferroni-Posttest; $p > 0,05 = ns$ (nicht signifikant), $p < 0,05 = *$ (schwach signifikant).

Die Messung in stark methylierten HCC-Primärtumoren und schwach methylierten Lebernorgangeweben lieferte keine signifikante Korrelation von Methylierung und Expression.

4.2.3.5 Zusammenfassung der Expressionsanalysen

Ein putativer Zusammenhang von Methylierung und Expression ist am einfachsten in dem Fall nachweisbar, wenn alle untersuchten Loci vollständig methyliert sind, was an dem Beispiel der hier untersuchten microRNAs Hsa-mir-9-1 und Hsa-mir-1 nicht gegeben ist. Insgesamt konnte somit demonstriert werden, dass eine zuverlässige Korrelationsmessung sich als schwierig gestaltet, wenn eine microRNA von drei unterschiedlich stark methylierten Loci, wie Hsa-mir-9, bzw. zwei verschiedenen Loci, wie Hsa-mir-1, exprimiert wird.

4.3 Bioinformatische Analysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *in silico* Analysemethoden verwendet, um einerseits Vorhersagen für die Versuchsplanung zu treffen, die die Zielrichtung der experimentellen Arbeiten vorgeben sollten, und um zum Anderen übergreifende Studien von bereits publizierten Daten anstelle von Experimenten auf schnellere Weise durchzuführen.

4.3.1 MicroRNA-Expressionsprofile anhand der Datenbank *mirZ*

Um einen Überblick über das Expressionsprofil der in den zuvor durchgeführten COBRA-, MSP-, qRT-MSP- und Pyrosequenzierungsexperimenten ermittelten microRNA-Kandidaten zu erlangen und um unsere eigenen Expressionsdaten zu vervollständigen, wurden sämtliche verfügbaren Expressionsdaten von der Datenbank *mirZ* (<http://www.mirz.unibas.ch/>) bezogen und über die Website grafisch dargestellt (Abbildung 48).

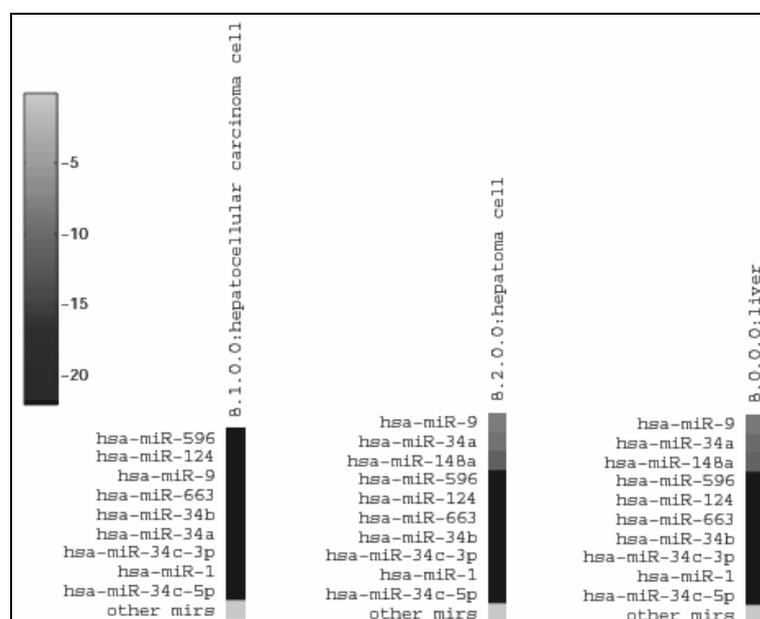


Abbildung 48 Expression der microRNA-Kandidaten. Log₂-Darstellung anhand *mirZ*-Daten; Von links nach rechts: Expression in Huh-7, Expression in HepG2 und PLC, Expression in Leber (♀, 43 Jahre); schwarz: nicht detektiert; blau: schwach exprimiert; grün: schwach exprimiert; gelb: hoch exprimiert; other mirs: maximale Expression anderer microRNAs (<http://www.mirz.unibas.ch/>).

Die microRNAs Hsa-mir-9, Hsa-mir-34a und Hsa-mir-148a werden schwach in gesunder Leber und in den Hepatom-Zelllinien HepG2 und PLC exprimiert. Diese Expression ist in der HCC-Zelllinie Huh-7 nicht mehr nachzuweisen. Alle anderen microRNA-Kandidaten weisen in den untersuchten Proben keine messbare Expression auf, wobei anzumerken ist, dass der Stichprobenumfang (n=6) nicht repräsentativ ist. Andere microRNAs, wie z.B. Hsa-mir-122 werden hingegen in der Leber stark exprimiert. Dennoch kann eine Herunterregulierung dieser drei microRNAs in der HCC-Zelllinie Huh-7 beobachtet werden.

4.3.2 Regulation und Konservierung der Kandidaten-microRNAs

4.3.2.1 Sequenzanalysen basierend auf dem UCSC Genome Browser, WWW Promoter Scan sowie CpG-Island Searcher und CpGplot

In einer übergreifenden *in silico* Analyse sind die Regulationsmechanismen, Konservierungsdaten, Methylierungsdaten und bisher analysierten Regionen aller microRNA-Kandidaten zusammengefasst worden. Hierzu wurden die Daten aus der Promotorvorhersage mit *WWW Promoter Scan*, den CpG-Insel-Vorhersagen mit *CpG-Island Searcher* und *CpGplot* und den Daten aus der Literatur sowie unserer eigenen Analysen mit den Daten aus dem *UCSC Genome Browser* übergreifend dargestellt. Die Daten aus dem *Genome Browser* umfassen konservierte Sequenzmotive in 17 Mammalia. Hierzu zählen Schimpanse, Rhesusaffe und Galago aus der Ordnung der Primaten sowie Spitzhörnchen, Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Spitzmaus, Igel, Hund Katze, Pferd, Rind, Gürteltier, Elefant und Tenrek aus der Unterklasse der Eutheria.

Mit diesen Daten wurde von uns ein *Phylogenetic Shadowing* durchgeführt (Maston et al., 2006). Außerdem sind genomweite Methylierungsdaten (Straussman et al., 2009), CpG-Inseln, Exons und Promotoren erfasst worden. Die CpG-Insel Vorhersagen mit *CpG-Island Searcher* und *CpGplot* sind des Weiteren als separate Grafiken aufgeführt, um detailliertere Informationen über die Lage der putativen CpG-Inseln zu liefern, als es mit den Vorhersagedaten aus dem *Genome Browser* möglich ist.

In der Abbildung 49 sind diese Daten dargestellt. Die obere Abbildung subsumiert die Regulations- und Methylierungsdaten eines microRNA-Kandidaten, indem als Basis eine Übersichtsgrafik aus dem *UCSC Genome Browser* verwendet wurde.

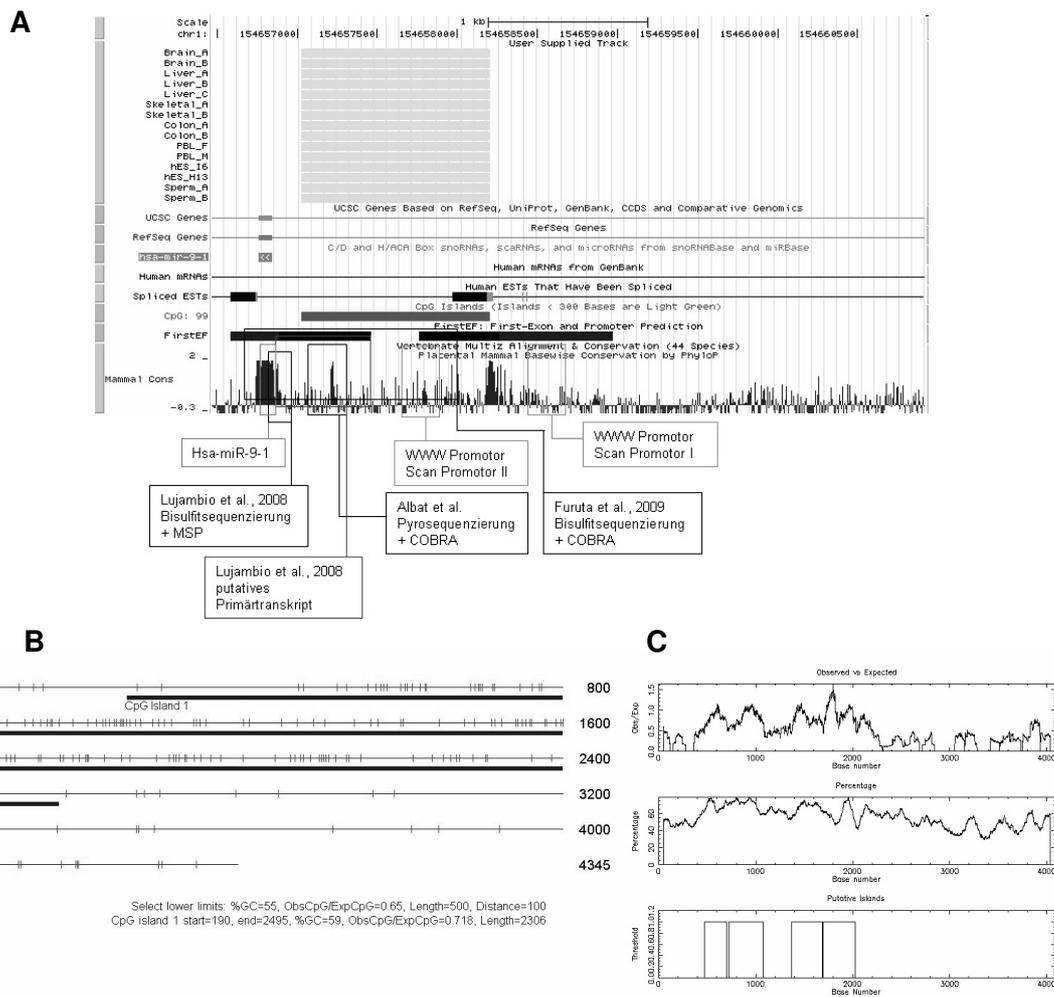


Abbildung 49 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-miR-9-1. (A) Darstellung des Methylierungsgrades der untersuchten CpG-Insel: grün= unmethyliert, schwarz= unbestimmt, rot=methyliert (Straussman et al., 2009); Lage von Genen und mRNAs (breite Balken=Exons, dünne Linien= Introns); putative CpG-Inseln (grüne Balken; hellgrüne Balken=<300bp Länge); Regulationsmechanismen aus FirstEF (schwarze Balken= putative Promotoren, CpG-Inseln und erste Exons); Konservierung in 17 Mammalia (blaue Histogrammfläche); (B) putative CpG-Insel nach Vorhersage mit *CpG-Island Searcher* (blaue Balken= CpG-Inseln; rote Striche= CpG-Dinukleotide; schwarze Linie= DNA-Sequenz (bp)); (C) putative CpG-Insel nach Vorhersage mit *CpGplot* (von oben nach unten: Kurven für das Verhältnis von beobachteten zu erwarteten CpG-Dinukleotiden, GC-Gehalt; CpG-Inseln (schwarz umrandete Box)).

Die Grafik enthält CpG-Inseln und deren Methylierung in untersuchten Geweben (Straussman et al., 2009), *FirstEF*-Daten zu Promotoren und Transkriptionsstartpunkten sowie konservierte Bereiche in verwandten Mammalia. Außerdem sind die wichtigsten untersuchten Loci aus dieser Arbeit und aus der Literatur angegeben. In der unteren Abbildung sind die detaillierten Sequenzdaten zu den vorhergesagten CpG-Inseln im 4000bp Kontext um die Precursor-microRNA dargestellt, die auf Nukleotidebene untersucht wurden, um ein genaueres Bild der Verteilung der CpG-Dinukleotide zu erhalten.

An dieser Stelle ist die microRNA Hsa-mir-9-1 exemplarisch abgebildet. Alle anderen Daten werden im Anhang A: Sequenzanalysen der microRNA-Kandidaten aufgeführt. Die Resultate dieser übergreifenden Analysen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Methylierung

Neun der microRNA-Kandidaten sind in allen drei Fällen der von Straussman et al., untersuchten gesunden Leber unmethyliert. Nur Hsa-mir-596 ist in 2/3 Fällen stark methyliert und in einem Fall schwach methyliert. Die microRNAs Hsa-mir-34a und Hsa-mir-663 sind in jeweils 2/3 Fällen schwach methyliert.

2. Konservierung

Die microRNAs Hsa-mir-1-1, Hsa-mir-9-1 - 9-3, Hsa-mir-34a-c, Hsa-mir-124-1 - 124-3 und Hsa-mir-148a gehören zu hoch konservierten microRNA-Familien, die microRNAs Hsa-mir-596 und Hsa-mir-663 zu schwach konservierten microRNA-Familien. Die 5'-regulatorischen Regionen der microRNAs Hsa-mir-9-2, Hsa-mir-124-1, Hsa-mir-124-2 und Hsa-mir-148a sind in 17 Mammalia hoch konserviert, die von Hsa-mir-1-1, Hsa-mir-9-3, Hsa-mir-124-3 und Hsa-mir-663 sind mittelmäßig konserviert. Die microRNAs Hsa-mir-9-1, Hsa-mir-34a-c und Hsa-mir-596 weisen nur schwach konservierte 5'-regulatorische Regionen auf.

3. Regulation

Es konnten putative Promotoren für alle microRNA-Kandidaten bis auf Hsa-mir-34a und Hsa-mir-596 identifiziert werden. Die Vorhersagen wurden der Publikation von Fujita et Iba (Fujita and Iba, 2008) und der *WWW Promoter Scan*-Analyse entnommen. Die experimentell ermittelten, putativen Primärtranskripte der microRNAs Hsa-mir-9-1 - 9-3, Hsa-mir-34a-c, Hsa-mir-124-1 und Hsa-mir-148a wurden aufgeführt, um die Lage der mittels Pyrosequenzierung zu untersuchenden Regionen besser eingrenzen zu können.

4. Fazit

Insgesamt zeigt sich ein vielschichtiges Bild unterschiedlicher Regulationsmechanismen der microRNA-Kandidaten, die bis auf zwei Ausnahmen in 17 Mammlia hoch konserviert sind. Diese Konservierung lässt den Schluss zu, dass diese microRNAs eine phylogenetisch wichtige Funktion innehaben. Da ein Teil der ermittelten regulatorischen Elemente ebenfalls konserviert ist, wird diese Hypothese dadurch bestärkt. Es scheinen alle microRNAs bis auf Hsa-mir-596 in gesunder Leber nicht oder nur schwach methyliert zu sein. Dies lässt bei den im HCC signifikant hypermethylierten microRNAs auf eine putative, aberrante Methylierung in der Hepatokarzinogenese schließen.

4.3.3 Biologische Funktion der microRNA-Kandidaten

4.3.3.1 Validierte Zielgene der microRNA-Kandidaten

Zum besseren Verständnis der biologischen Funktion der in dieser Arbeit ermittelten Kandidaten-microRNAs wurden zunächst alle bis dato bekannten validierten Zielgene dieser microRNAs ermittelt. Hierzu wurden die Datenbanken miRecords, DIANA TarBase und MMMP als Quellen verwendet. Anzumerken ist, dass die Validierung dieser Zielgene nicht ausschließlich auf Proteinebene, sondern auch häufig durch einfache Expressionsstudien der microRNAs und ihrer Zielgene erfolgte.

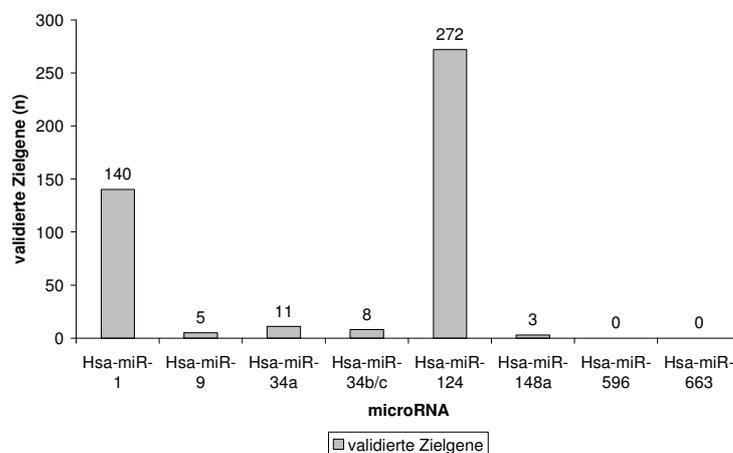


Abbildung 50 Experimentell validierte Zielgene der microRNA-Kandidaten.

Auffällig ist hierbei die große Differenz in der Anzahl der je microRNA validierten Zielgene, die eine Folge der unterschiedlich intensiv betriebenen wissenschaftlichen Forschung an der jeweiligen microRNA ist (Abbildung 50). Da diese Daten jedoch nicht vollständig sind und nur den aktuellen Stand der Forschung repräsentieren, ist eine allgemeingültige Aussage über die Anzahl sowie sämtliche involvierte biologische Prozesse noch nicht möglich.

Bei der Betrachtung dieser teilweise großen Anzahl an validierten Zielgenen (Hsa-mir-124: 272 Zielgene) muss die Art der Validierung näher betrachtet werden. Die meisten der in diesen Datenbanken eingetragenen, validierten Zielgene basieren auf Ergebnissen von Expressionsstudien, in denen die Expression von microRNAs mit der Expression bestimmter, meist zuvor *in silico* berechneter Zielgene verglichen wurde. Falls diese Daten invers korrelierten, wurde die Regulation eines Gens durch eine microRNA postuliert und somit ein validiertes Zielgen ermittelt.

Andere Zielgene wurden durch weitaus komplexere Untersuchungen validiert, die die Interaktion der microRNA und ihrem Zielgen von unterschiedlichen Seiten betrachten.

Da experimentell validierte Zielgene von allen Kandidaten bis auf Hsa-mir-596 und Hsa-mir-663 in den drei verwendeten Datenbanken entdeckt worden sind, ist eine Funktionsanalyse eines Teils der Zielgene möglich. Im Kapitel 5.5 wird näher auf die Funktionen dieser Zielgene eingegangen.

4.3.4 Bioinformatische Vorhersage von microRNA-Zielgenen

4.3.4.1 Evaluation von microRNA-Zielgen-Vorhersage-Algorithmen

Da die microRNA Hsa-mir-1-1 als im HCC differentiell methyliert und exprimiert beschrieben worden ist (Datta et al., 2008) und in der Analyse mit verschiedenen Algorithmen jeweils eine hohe Ausbeute an putativen Zielgenen liefert, wurden bei der Untersuchung der putativen Zielgene von Hsa-mir-1-1 die Resultate von sieben microRNA-Zielgen-Vorhersage-Programmen systematisch verglichen: *TargetScan.org*, *microRNAMap*, *DIANA TarBase*, *PicTar*, *TargetScanS*, *mirDB* und *miranda*. Diese Daten wurden im Folgenden den auf Proteinebene experimentell validierten Zielgenen von hsa-mir-1-1 gegenübergestellt. Weiterhin wurde das Programm *DAVID* verwendet, um die Schnittmengen der Resultate der Zielgenvorhersage in funktionale Gen-Ontologie (GO)-Kategorien einzuordnen.

Die untersuchten Programme zeigten starke Abweichungen in der Anzahl der ermittelten Zielgene: $n=107$ (*DIANA TarBase*), $n=209$ (*TargetScanS*), $n=367$ (*mirDB*), $n=414$ (*microRNAMap*), $n=418$ (*PicTar*), $n=480$ (*TargetScan.org*) bzw. $n=1869$ (*miranda*). Obwohl einige Programme ähnliche Zielengruppen identifizierten, resultierte die Analyse aller Zielgene in zahlreichen verschiedenen Ontologie-Clustern.

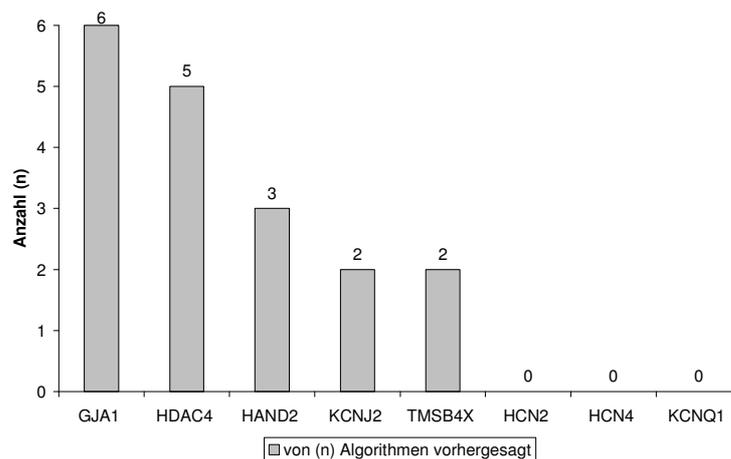


Abbildung 51 Anzahl der Algorithmen, die ein Zielgen von Hsa-mir-1 vorhersagen konnten.

Die Kandidaten-Zielgene von Hsa-mir-1-1, die von mindestens 6 Programmen vorhergesagt wurden, ließen sich in keinem Ontologie-Cluster mehr zusammenfassen. Als Folge davon löste sich jegliche vorherige Schnittmenge auf.

Es wurde daher als nächstes betrachtet, welche experimentell validierten Zielgene von Hsa-mir-1 durch die sechs verwendeten Algorithmen vorhergesagt werden konnten. Es zeigte sich hierbei, dass nur ein einziges Zielgen (*GJA1*) von allen sechs reinen Algorithmen vorhergesagt wurde (Abbildung 51).

Aufgrund dieser Daten wurde die Sensitivität und Spezifität der Programme betrachtet. Die höchste Spezifität bei gleichzeitig hoher Sensitivität sollte als Kriterium zur Auswahl des besten Programms dienen (Abbildung 52). Durch den Schnittpunkt beider Kurven wurden das Verhältnis von Sensitivität zu Spezifität eines Programms visualisiert.

Nach dieser Auswertung ergaben sich drei Kandidaten als bestes Programm: *DIANA TarBase* mit der höchsten Spezifität, *miranda* mit der größten Sensitivität und *TargetscanS* als das Programm mit der höchsten simultanen Sensitivität und Spezifität. Insgesamt war keine zufrieden stellende *in silico* Vorhersage möglich, da zu viele putative Zielgene je Algorithmus vorhergesagt wurden.

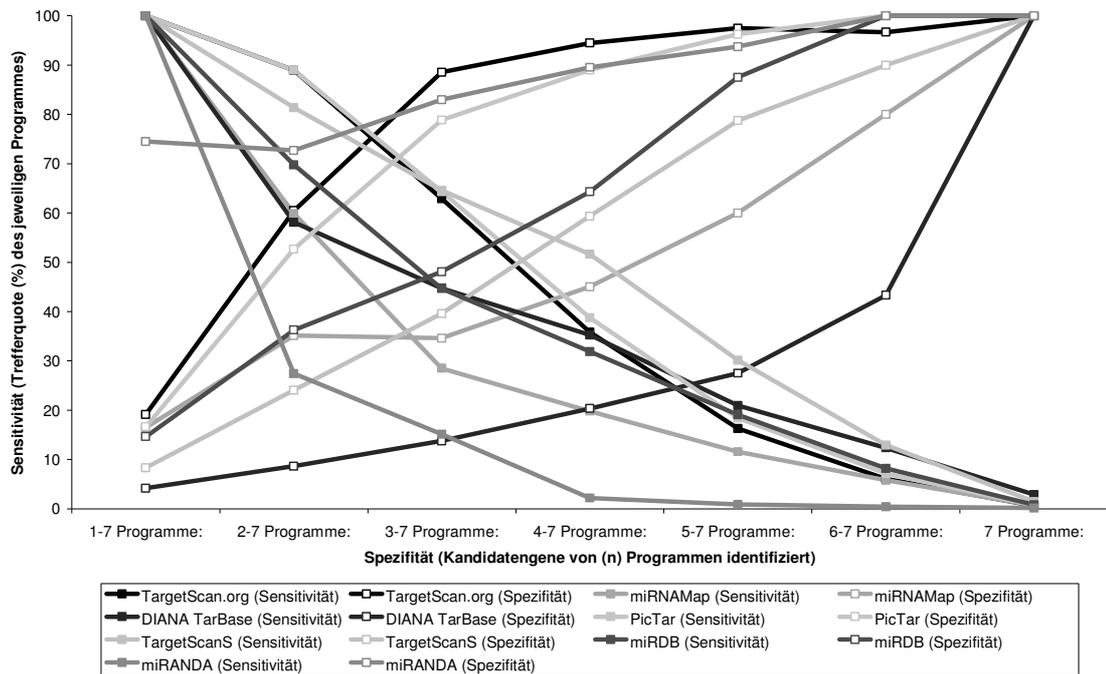


Abbildung 52 Vergleich von Sensitivität und Spezifität der sieben microRNA-Zielgen-Vorhersageprogramme. Sensitivität= prozentuale Trefferquote des jeweiligen Programms an der Schnittmenge der Treffer aller Programme; Spezifität= Kandidaten-Zielgen der microRNA wurde von (n) Programmen parallel identifiziert.

Daher wurde die Schnittmenge der drei besten Programme (*DIANA TarBase*, *TargetscanS* und *miranda*) als beste Vorhersagemöglichkeit gewertet. Diese Daten entstanden jedoch nur aus der Analyse der Zielgene einer microRNA (Hsa-mir-1) und so wurden anhand der Publikation von Sethupathy et al. (Sethupathy et al., 2006) weitere Kriterien zur Auswahl einer optimalen Algorithmenkombination untersucht. Anhand dieser Publikation, den Daten von Ritchie et al. und unseren eigenen Daten wurde geschlossen, dass drei Algorithmen mit sich ergänzenden Eigenschaften die beste Grundlage für eine microRNA-Zielgenanalyse bilden, da einige Algorithmen nahezu identische Resultate liefern (Ritchie et al., 2009).

4.3.4.2 Eine neue Methode der microRNA-Zielgenvorhersage

Im Zuge der microRNA-Zielgen-Analyse der finalen microRNA-Kandidaten wurden die drei aus der Literatur und unseren eigenen Testreihen ausgewählten Algorithmen, *TargetscanS*, *PicTar* und *miRanda* verwendet, um eine verbesserte Methode zur Vorhersage von microRNA-Zielgenen zu etablieren.

Der Grundgedanke hierbei bestand darin, dass die mehrfache Nennung eines Gens im Output eines Algorithmus bedeutet, dass mehrere Bindungsstellen einer microRNA in der 3'-UTR derselben mRNA vorhanden sein können. Die Programme *Targetscan.org*, *TargetscanS*, *DIANA-microT*, *miranda* und *PicTar* arbeiten nach diesem Prinzip.

Daher sollte eine verbesserte Auswahl im Output der drei von uns gewählten Algorithmen durch Berücksichtigen dieser putativ stärker regulierten Zielgene erfolgen.

Es wurden drei Programme aus der Literatur, *miRecords*, *mirGator* und *mirWalk* ausgewählt und getestet, um ein möglichst umfassendes Bild der heute verfügbaren microRNA-Zielgenvorhersage-Programme zu erhalten.

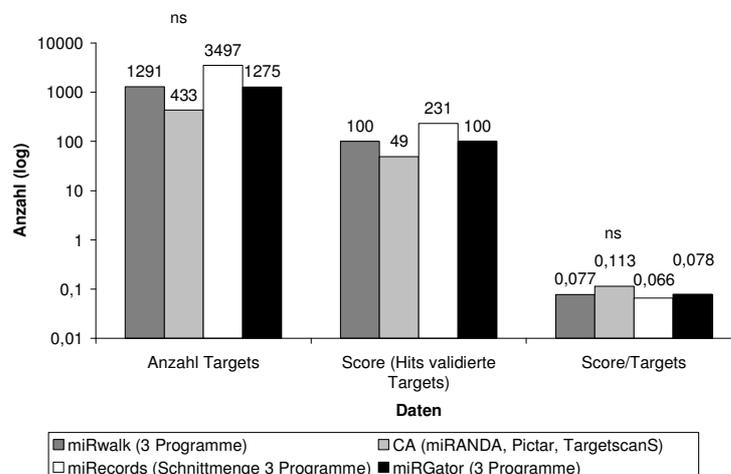


Abbildung 53 Auswertung der microRNA-Zielgen-Vorhersage nach CA am Beispiel Hsa-mir-124. (202 validierte Zielgene); Dargestellt sind die Anzahl der vorhergesagten putativen Zielgene, die Anzahl der vorhergesagten validierten Zielgene (Score) und der Quotient von Score /vorhergesagten Zielgenen; p-Wert nach Grubb's Outlier Test (Graphpad QuickCalcs).

Um die Effizienz der neuen, von uns entwickelten Methode zu testen, wurden diese drei Programme als Richtwerte verwendet. Als Testobjekte wurden die vier microRNAs mit den meisten experimentell validierten Zielgenen aus der Datenbank miRecords ausgewählt. Es wurden die Scores ermittelt und mit einem Grubb's Outlier Test (Graphpad

QuickCalcs) auf Signifikanzen geprüft (ns [nicht signifikant] $p > 0,05$; * [schwach signifikant] $p < 0,05$; ** [signifikant] $p < 0,01$).

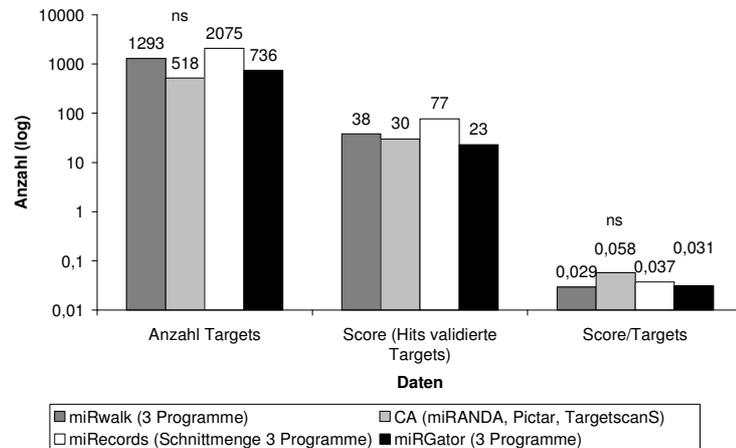


Abbildung 54 Auswertung der microRNA-Zielgen-Vorhersage nach CA am Beispiel Hsa-mir-1. (111 validierte Zielgene); Dargestellt sind die Anzahl der vorhergesagten putativen Zielgene, die Anzahl der vorhergesagten validierten Zielgene (Score) und der Quotient von Score /vorhergesagten Zielgenen; p-Wert nach Grubb's Outlier Test (Graphpad QuickCalcs).

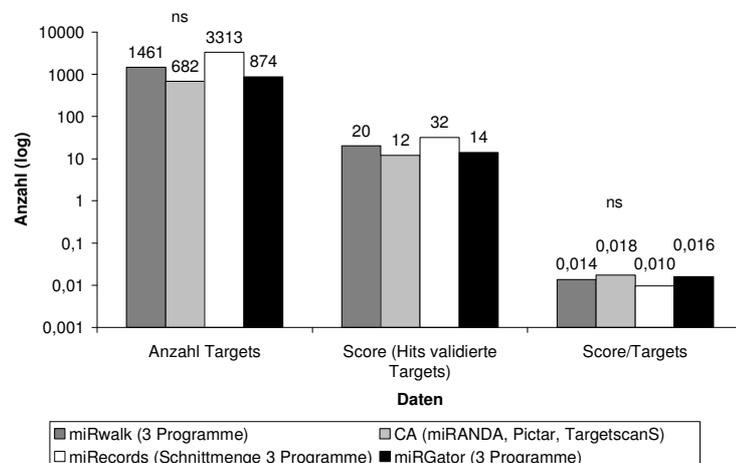


Abbildung 55 Auswertung der microRNA-Zielgen-Vorhersage nach CA am Beispiel Hsa-mir-16. (76 validierte Zielgene); Dargestellt sind die Anzahl der vorhergesagten putativen Zielgene, die Anzahl der vorhergesagten validierten Zielgene (Score) und der Quotient von Score /vorhergesagten Zielgenen; p-Wert nach Grubb's Outlier Test (Graphpad QuickCalcs).

Die hier beschriebene, neue Methode liefert bei den untersuchten microRNAs mit ≥ 76 validierten Zielgenen bessere Resultate als die drei anderen untersuchten Programme (Abbildung 53, Abbildung 54 und Abbildung 55). Bei einem kleineren Datensatz an validierten Zielgenen ($n=43$) fällt die neue Methode hinter die bestehenden Programme

zurück (Abbildung 56). Die Unterschiede sind statistisch zwar nicht signifikant, aber tendenziell zu erkennen.

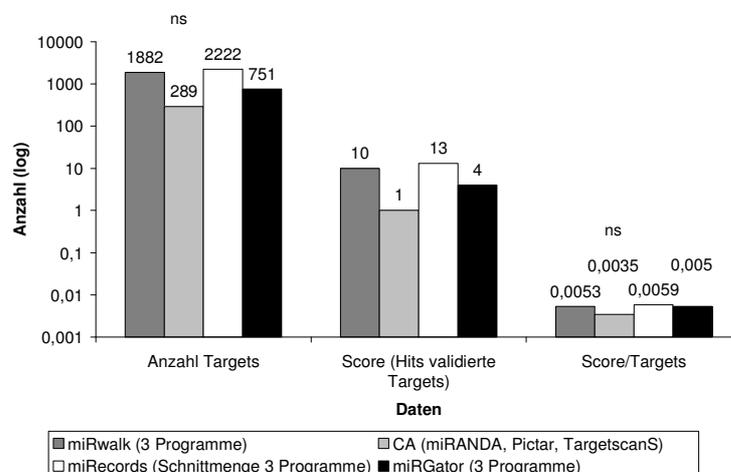


Abbildung 56 Auswertung der microRNA-Zielgen-Vorhersage nach CA am Beispiel Hsa-mir-125b. (43 validierte Zielgene); Dargestellt sind die Anzahl der vorhergesagten putativen Zielgene, die Anzahl der vorhergesagten validierten Zielgene (Score) und der Quotient von Score /vorhergesagten Zielgenen; p-Wert nach Grubb's Outlier Test (Graphpad QuickCalcs).

In der Tabelle 58 sind die Resultate der Zielgenvorhersage für die vier microRNAs Hsa-mir-124, Hsa-mir-1, Hsa-mir-16 und Hsa-mir-125b zusammengefasst.

microRNA	Validierte Zielgene	mirWalk	Methode CA	miRecords	mirGator
Hsa-mir124	202	0,080	0,113	0,066	0,078
Hsa-mir1	111	0,029	0,058	0,037	0,031
Hsa-mir16	76	0,014	0,018	0,010	0,016
Hsa-mir125b	43	0,0053	0,0035	0,0059	0,005

Tabelle 58 Zusammenfassung der Testreihe microRNA-Zielgenvorhersage nach CA. Dargestellt sind die errechneten Scores der microRNAs aus den Abbildungen oben; grau hinterlegt: Score der besten Methode.

Aus dieser Untersuchung geht hervor, dass bei einem ausreichend großen Set an experimentell validierten Zielgenen (Hsa-mir-16: 76 Zielgene) in Relation zu der Menge an vorhergesagten Zielgenen die hier neu entwickelte Methode bei allen drei microRNAs das tendenziell beste Verhältnis von vorhergesagten, validierten Zielgenen zur Gesamtmenge an vorhergesagten microRNAs liefert.

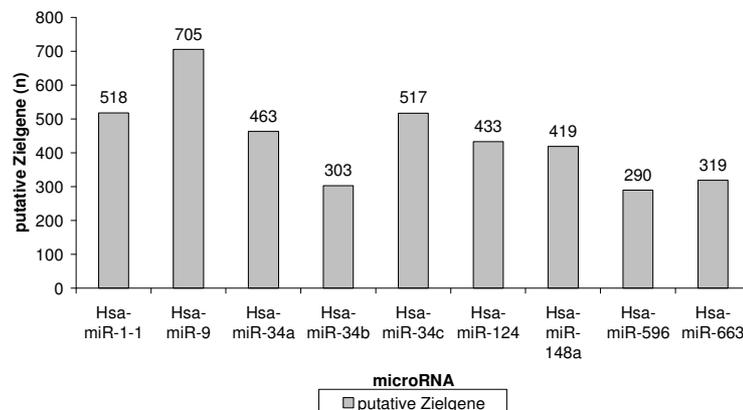


Abbildung 57 Putative Zielgene der microRNA-Kandidaten. Die Berechnung erfolgte nach der Methode CA mit Score ≥ 3 .

In Folge dieser Testreihe wurden schließlich die putativen Zielgene aller microRNA-Kandidaten mit der neuen Methode nach CA berechnet.

Zielgene miR-1	Score	Zielgene miR-9	Score	Zielgene miR-34a	Score	Zielgene miR-34b	Score	Zielgene miR-34c	Score
CREM	43	CTNND1	109	EMR2	28	PTPRD	18	GPR64	31
CACNA1C	42	NA	29	GPR64	21	SAPS3	15	PLAGL1	19
BDNF	34	CLCN5	16	PLAGL1	19	FN1	11	TCRA	19
PAX3	22	DMD	16	PTPRD	18	CTAGE5	10	MITF	18
GPR64	20	MIER3	16	TCRA	18	PDE4D	10	DMD	16
RNF38	19	NR1I3	16	DMD	16	SMAD5	10	ICA1	16
LARP4	18	CPEB2	15	ST3GAL3	14	TRPM3	10	EMR2	14
PDE4D	18	PCDH11X	15	TRAC	14	TUG1	10	ST3GAL3	14
FN1	17	BACE1	14	ANK2	12			TRAC	14
MYLK	17	OPTN	14	HMGAI	11			VEGFA	14
RIMS1	16	PRDM10	14	PCBP4	11			ANK2	12
HNRPK	15	RNF111	14	ALDOA	10			WT1	12
QKI	15	ST3GAL3	14					HMGAI	11
MATR3	14	ARMCX4	13					PCBP4	11
CLCN5	12	HIPK1	13					QKI	11
COL6A3	12	NCOA7	13					SLC38A1	11
FHL1	12	NDRG2	13					ALDOA	10
ADAR	11	P4HA2	13					BACE1	10
AP1G1	10	RNF38	13					DTNA	10
ARHGAP5	10	AFF2	12					MTSS1	10
COL4A3	10	CREB5	12						
EYA4	10	FOXP1	12						
HIPK1	10	GABRB2	12						
IKZF2	10	NIP30	12						
PRDM10	10	NOX4	12						
		TNRC6A	12						
		ZNF37A	12						
		FN1	11						
		BIN1	10						
		CACNB2	10						
		DIXDC1	10						
		IKZF2	10						
		INSC	10						
		MIER1	10						
		ONECUT2	10						
		PHLDB2	10						
		RBM24	10						
		ROD1	10						

Tabelle 59 Putative Zielgene der microRNA-Kandidaten mit Score ≥ 10 . Zielgene der microRNAs Hsa-mir-1, Hsa-mir-9, Hsa-mir-34a, Hsa-mir-34b und Hsa-mir-34c.

In der Abbildung 57 sind die Summen aller Zielgene mit einem Score ≥ 3 dargestellt. Um diese große Datenmenge weiter einzugrenzen, wurden in Tabelle 59 und Tabelle 60 die besten Zielgen-Kandidaten mit einem Score ≥ 10 dargestellt.

Zur Strukturierung und Kondensierung dieser Daten wurde eine funktionale Einteilung in Gen-Ontologie-Cluster vorgenommen, die im nächsten Kapitel beschrieben ist.

Zielgene miR-124	Score	Zielgene miR-148a	Score	Zielgene miR-596	Score	Zielgene miR-663	Score
CTNND1	56	PTPN20A	32	DMD	17	ELN	36
NA	50	CACNA1C	21	ST3GAL3	17	MYB	18
PTPRD	18	CACNB2	20	ELN	13	ZNF385	16
CLDND1	14	MITF	19	HMGA1	12	NFIX	15
MITF	13	NA	19	SORBS2	10	KLC2	14
E2F6	11	RNF38	19			ST3GAL3	14
GPR64	10	PDE4D	18			HNRPUL1	13
MAGED4	10	SLC12A6	16			HMGA1	12
RAD17	10	NFAT5	15			USF2	12
ROD1	10	RTN4	15			ARHGDI1	11
		MIER1	14			ILK	11
		ZC3H14	14			C20orf27	10
		CAST	13			CD37	10
		ANK2	12			DKFZp547E087	10
		ESRRG	12			GNB2	10
		QKI	11			LMNA	10
		AF400501	10				
		GAPVD1	10				
		HIPK1	10				
		RHOBTB1	10				
		SFRS11	10				

Tabelle 60 Putative Zielgene der microRNA-Kandidaten mit Score ≥ 10 . Zielgene der microRNAs Hsa-mir-124, Hsa-mir-148a, Hsa-mir-596 und Hsa-mir-663.

4.3.5 Genontologie-Kategorisierung der putativen Zielgene der microRNA-Kandidaten

Als Datenpool für das GO-Clustering mit dem Programm DAVID sind die Zielgene der microRNA-Kandidaten verwendet worden, die laut Vorhersagemethode von CA einen Score von ≥ 3 erhalten hatten. Es wurde eine Einteilung der Schnittmengen aller putativen Zielgene unserer microRNA-Kandidaten in funktionale Cluster (*Functional Annotation Clustering*) vorgenommen. Darauf hin wurden die Signalwege, welche die Oberbegriffe für diese Zielgen-Cluster symbolisieren, nach *Enrichment Score* sortiert und diese Daten grafisch dargestellt.

Die Zielgene von Hsa-mir-596 ließen sich nicht in Signalwege gruppieren. Daher wurden nur die zehn häufigsten biologischen Prozesse dargestellt, die nach ihrem p-Wert sortiert sind. Als Beispiel ist hier Hsa-mir-9 aufgeführt (Abbildung 58); die Daten aller anderen microRNA-Kandidaten befinden sich im Anhang B: GO-Kategorisierung der Zielgene der microRNA-Kandidaten.

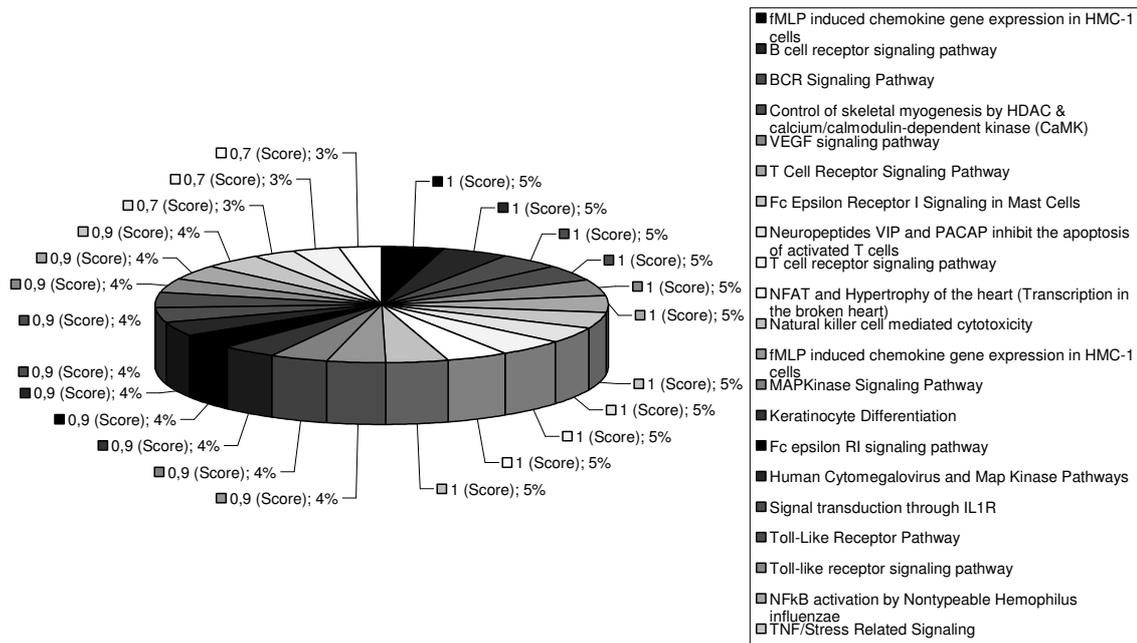


Abbildung 58 Verteilung des *Enrichment Score* der Stoffwechselwege der putativen Zielgene von Hsa-mir-9. In der Legende sind die Stoffwechselwege und Krankheiten der involvierten Gene verzeichnet.

Im Folgenden wurde eine übergreifende Analyse der putativen Zielgene aller microRNA-Kandidaten durchgeführt, um Parallelen der Zielgen-Cluster aufzudecken. Hierbei lag der Focus auf krebsassoziierten Signalwegen sowie allen bekannten Krebsarten.

4.3.5.1 Krebspezifische putative Zielgene der microRNA-Kandidaten

Ein Teil der putativen Zielgene von Hsa-mir-1, Hsa-mir-9, Hsa-mir-34, Hsa-mir-124 und Hsa-mir-148a sind mit dem VEGF-Signalweg, der eine wichtige Rolle bei der Angiogenese von soliden Tumoren spielt, assoziiert.

Einige Zielgene von Hsa-mir-9, Hsa-mir-34 und Hsa-mir-148a sind mit der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität verbunden. Hsa-mir-9, Hsa-mir-34 und Hsa-mir-124 sind zudem mit den Stress- und Apoptosefaktoren TNF und NFkB und dem MAPK Signalweg verknüpft. Die von Hsa-mir-34 und Hsa-mir-124 putativ regulierten Zielgene sind mit Apoptose in Verbindung gebracht worden.

Die putativen Zielgene von Hsa-mir-1 sind teils mit Pankreaskarzinomen und Nierenzellkarzinomen, ein Teil der putativen Zielgene von Hsa-mir-34 mit Prostatakarzinomen, Kleinzelligen Lungenkarzinomen, chronischer myeloischer Leukämie, Endometri-

umskarzinomen, Nicht-Kleinzelligen Lungenkarzinomen, Gliomen und Nierenzellkarzinomen assoziiert. Die Zielgene von Hsa-mir-148a waren teils mit Gliomen, Melanomen und Prostatakarzinomen verknüpft.

Die untersuchten Zielgene der microRNAs Hsa-mir-596 und Hsa-mir-663 konnten in keine krebsspezifischen Signalwege oder biologische Prozesse eingeteilt werden.

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass mit den derzeit verfügbaren Möglichkeiten keine sinnvolle Eingrenzung der Zielgene der untersuchten microRNA-Kandidaten möglich ist.

4.3.6 Genomische und regulatorische microRNA-Datenbank

Im Zuge der laufenden Forschungsarbeiten sollte eine Datenbank erstellt werden, in der umfassende Daten über die Regulation und Expression von microRNAs anhand des aktuellen Stands der Forschung zusammengefasst werden.

Ifd. Nr.	Micro-RNA	Chromosom (Strang)	Lokalisation (bp)
64	Hsa-mir-9-1	1 (-)	154656757-154656845

CpG-Insel-Assoziation	Genome Browser	WWW PromoterScan	Lage auf Exon/Intron/frei
Bild der CpG-Insel	genomischer Kontext	putativer Promotor	Intron Gene C1orf61, viele EST Introns

microRNAs in 10000bp			
Lage auf mRNA/frei	Kontext	microRNA Clusters	HCC assoziiert
frei	keine	keine	hochreguliert/herunterreguliert

Tabelle 61 Auszug aus der genomischen und regulatorischen microRNA-Datenbank. Die Einträge mit Hyperlinks führen zu grafischen Darstellungen der Untersuchungsdaten.

Die Datenbank enthält putative Promotoren, die mit *WWW Promoter Scan* vorhergesagt wurden, putative CpG-Inseln aus den Analysen mit *CpG-Island Searcher* und *CpGplot* sowie bioinformatisch vorhergesagte Regulationsmechanismen anhand der Daten des *UCSC Genome Browsers*. Aus dem *Genome Browser* wurden außerdem genomische Daten über die Lage der microRNAs (auf einem Exon oder einem Intron) sowie Daten über mögliche Cluster und Promotorassoziation der microRNA verwendet.

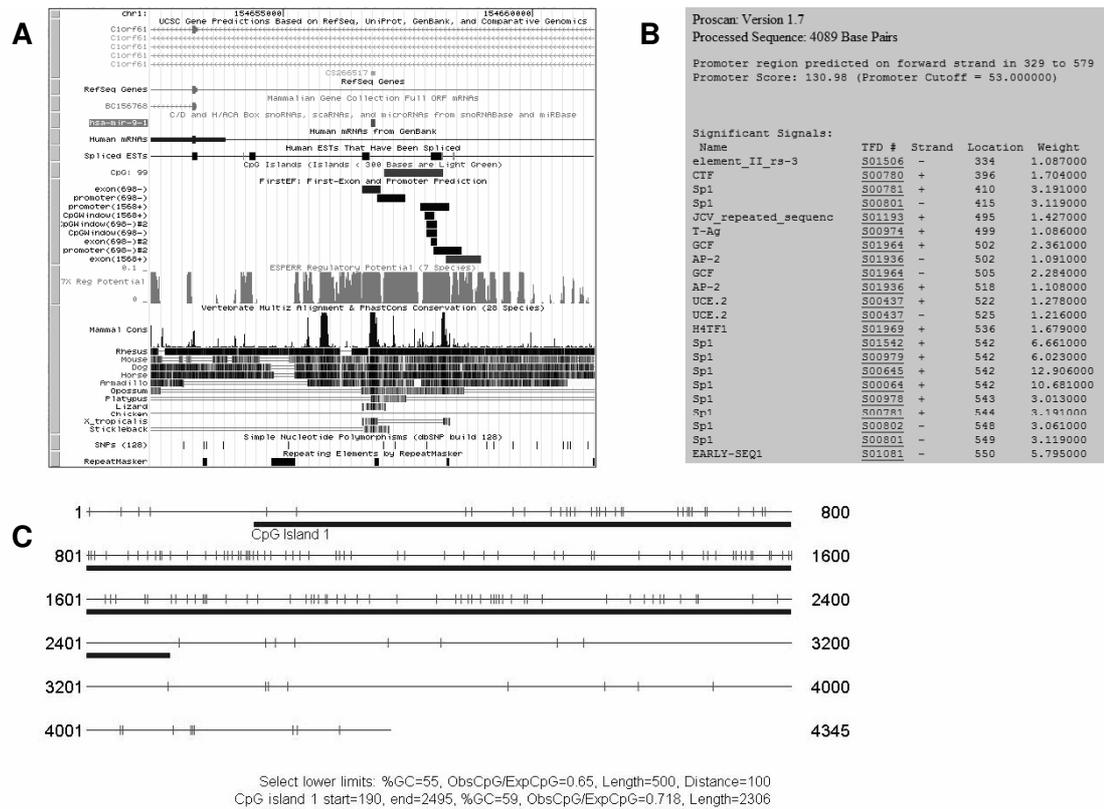


Abbildung 59 Informationsdateien der microRNA-Datenbank. UCSC Genome Browser (A); WWW Promoter Scan (B); CpG-Island Searcher (C).

Tabelle 61 gibt anhand der Daten von Hsa-mir-9-1 einen exemplarischen Überblick über die Datenbank. Die mit Hyperlinks hinterlegten Einträge ermöglichen das sofortige Öffnen von Dateien mit grafischen Darstellungen der Ergebnisse der jeweiligen bioinformatischen Analysen (Abbildung 59). Dies dient einem ersten Überblick, um grundsätzliche Informationen schnell zu erlangen. Zur Zeit ist die Erweiterung dieser Datenbank auf alle zum heutigen Zeitpunkt experimentell validierten microRNAs in Arbeit.

Anhand dieser Datenbank, die laufend um die neuesten experimentellen Forschungsergebnisse und bioinformatischen Vorhersagen ergänzt wird, soll ein umfassendes Bild der genomischen Organisation sowie der Regulationsmechanismen von microRNA-Genen erstellt werden.

5 Diskussion

5.1 Methylierungsanalysen von CpG-Insel assoziierten microRNAs

5.1.1 Methylierung von microRNAs in der Literatur

In dieser Arbeit sind zunächst die zum damaligen Zeitpunkt (März 2007) bekannten CpG-Insel-assoziierten microRNAs in einer semiquantitativen COBRA auf putative Hypermethylierungen hin untersucht worden. Da bereits microRNA-Kandidaten aus der Analyse im Mammakarzinom bekannt waren (Lehmann et al., 2008), sollten deren epigenetische Modifikationen auch in der Leber betrachtet werden.

Neben den CpG-Insel-assoziierten microRNAs, die nach der ersten COBRA-Untersuchung in HCC-Zelllinien differentiell methyliert waren, wurde auch die Literatur systematisch ausgewertet. Die aus diesen Publikationen ausgewählten microRNAs sollten einer hochauflösenden, quantitativen Analyse unterzogen werden, da die in den entsprechenden Publikationen (Tabelle 62) verwendeten qualitativen Untersuchungen, wie die MSP, aufgrund der mangelnden Quantifizierbarkeit der Resultate lediglich als Schnellscreening zu werten sind.

Die anhand der vorangegangenen Publikationen ermittelten Methylierungsdaten unserer microRNA-Kandidaten (Tabelle 49) werden im Folgenden diskutiert.

Bei einer übergreifenden Methylierungsanalyse konnten Lodygin et al. in einer MSP-Analyse feststellen, dass Hsa-mir-34a in 24/110 humanen Zelllinien sowie in 19/24 Prostatakarzinomen hypermethyliert ist, aber keine Methylierung im Prostatastroma vorliegt (Lodygin et al., 2008). Nach der Untersuchung von oralen Plattenepithelkarzinomen demonstrierten Kozaki et al, dass die microRNA Hsa-mir-34b in dieser Tumorart nicht differentiell methyliert war (Kozaki et al., 2008). In der Studie von Toyota et al. wurde die Hypermethylierung der microRNAs Hsa-mir-34b/c in 101 von 111 (90%) primären kolorektalen Karzinomen sowie eine schwache oder fehlende Methylierung in normaler Kolonschleimhaut beschrieben (Toyota et al., 2008).

microRNA	publizierter Promotor/TSS
Hsa-mir-1-1	nein, nur CpG-Insel in: (Datta et al., 2008)
Hsa-mir-9-1	(Lujambio et al., 2008)
Hsa-mir-9-2	(Lujambio et al., 2008)
Hsa-mir-9-3	(Lujambio et al., 2008)
Hsa-mir-34a	(Tarasov et al., 2007)
Hsa-mir-34b/c	(Toyota et al., 2008) und (Lujambio et al., 2008)
Hsa-mir-124-1	ja und CpG-Insel in: (Lujambio et al., 2007)
Hsa-mir-124-2	nein, nur CpG-Insel in: (Lujambio et al., 2007)
Hsa-mir-124-3	nein, nur CpG-Insel in: (Lujambio et al., 2007)
Hsa-mir-148a	(Lujambio et al., 2008)
Hsa-mir-596	nein, nicht beschrieben
Hsa-mir-663	nein, nicht beschrieben

Tabelle 62 Publierte Promotoren und regulatorische Elemente der microRNA-Kandidaten.

In einer weiteren übergreifenden Studie zeigten Lujambio et al. die Hypermethylierung von Hsa-mir-34b/c, Hsa-mir-148a, Hsa-mir-9-1, Hsa-mir-9-2 und Hsa-mir-9-3 in Kolonkarzinomen, Lungenkrebs, Brustkrebs, Kopf-Hals-Karzinomen und Melanomen (Lujambio et al., 2008). Die Methylierung der microRNA-Familien Hsa-mir-9 und Hsa-mir-34 schien somit überwiegend tumorspezifisch zu sein.

Lujambio et al. demonstrierten weiterhin, dass Hsa-mir-124a1, Hsa-mir-124a2 und Hsa-mir-124a3 in Kolonkarzinomen, Brustkrebs, Lungenkrebs, Leukämie und Lymphomen hypermethyliert sind (Lujambio et al., 2007). Die Daten von Weber et al. zeigten, dass Hsa-mir-124 in normalem Kolongewebe unmethyliert, aber in primären Kolonkarzinomen hypermethyliert ist (Weber et al., 2007). Eine allgemeine Methylierung dieser microRNA-Familie in Tumorzellen wurde von Lujambio et Esteller beschrieben (Lujambio and Esteller, 2007).

Im Mammakarzinom wurde eine aberrante Methylierung von Hsa-mir-9-1 zusammen mit Hsa-mir-124a3, Hsa-mir-148, Hsa-mir-152 und Hsa-mir-663 beobachtet. Die Methylierung von Hsa-mir-9-1 korrelierte mit der Methylierung putativer Tumorsuppressorgene wie zum Beispiel *SOCS-1* oder *RASSF1A*. Nach der Behandlung mit einem demethylierenden Agens (5-Aza-2'-Deoxycytidin) konnte eine Verminderung der Methylierung von Hsa-mir-9-1 beobachtet werden (Lehmann et al., 2008).

Agirre et al. stellten die These auf, dass es sich bei Hsa-mir-124 um eine Familie von Tumorsuppressor-microRNAs handelt, die in ihrem Beispiel in der ALL (*acute*

lymphoblastic leukemia) epigenetisch inaktiviert wird (Agirre et al., 2009). Somit kann auch im Fall der Hsa-mir-124-Familie von einer tumorspezifischen Methylierung gesprochen werden.

Roman-Gomez et al. untersuchten die Methylierung mehrerer microRNAs in akuter lymphoblastischer Leukämie: Dabei war Hsa-mir-124a1 in 49% der Fälle, Hsa-mir-124a2 in 46%, Hsa-mir-124a3 in 42%, Hsa-mir-34b/c in 34%, Hsa-mir-9-1 in 34%, Hsa-mir-9-3 in 33% und Hsa-mir-9-2 in 21% der Fälle methyliert (Roman-Gomez et al., 2009).

Insgesamt kann festgehalten werden, dass von allen in dieser Arbeit untersuchten microRNA-Kandidaten bis auf Hsa-mir-596 eine tumorspezifische, aberrante Methylierung in unterschiedlichen Krebsarten bekannt ist.

5.1.2 Regulation und Funktion von microRNAs

Der Promotor von Hsa-mir-34a gehört zu den am besten untersuchten cis-regulatorischen Regionen von microRNA-Genen, der von Tarasov et al. (Tarasov et al., 2007) und Corcoran et al. (Corcoran et al., 2009) beschrieben wurde. Doch die regulatorischen Elemente der meisten der ermittelten microRNA-Kandidaten sind noch unbekannt. Von den microRNA-Familien Hsa-mir-9 und Hsa-mir-124 sind ebenso wie von der microRNA Hsa-mir-148a Primärtranskripte bekannt. Lediglich der Promotor von Hsa-mir-124-1 wird einmalig beschrieben (Lujambio et al., 2007).

Inter- und intragenische microRNA-Transkripte werden von Pol II-Promotoren aus einer Entfernung von bis zu 40kb vor der Precursorsequenz transkribiert. Pri-microRNAs können demnach zehntausende Basen lang sein, viel länger, als bisher angenommen (Corcoran et al., 2009).

Regulatorische Elemente müssten somit auch in einem viel größeren Bereich gesucht werden, als es in den meisten Untersuchungen einschließlich dieser Arbeit geschehen ist. Eine weitere Einschränkung ist die Tatsache, dass 26% der intragenischen microRNAs von ihren eigenen Promotoren ausgehend transkribiert werden. Die meisten dieser intragenischen microRNAs sind nicht CpG-Insel-assoziiert (Corcoran et al., 2009).

Bei der Analyse von CpG-Inseln und den damit assoziierten Promotorstrukturen wurde festgestellt, dass Akkumulationen von CpG-Dinukleotiden im Bereich von -400bp bis 400bp der TSS vorkommen (Aerts et al., 2004). Dies ist teilweise deckungsgleich mit

dem Kernpromotorbereich, der bei -550bp bis 50bp der TSS liegt (Trinklein et al., 2003). Diese Daten bestätigen die Untersuchungen von Gao et al., die in einer Publikation beschreiben, dass sie promotorassoziierte CpG-Inseln im Bereich bis 400bp vor der TSS untersucht haben (Gao et al., 2008).

MicroRNAs können, wie andere Gene auch, einen eigenen Promotor besitzen. Untersuchungen von Zhou et al. haben gezeigt, dass >90% der menschlichen microRNA-Promotoren im Bereich von 1000bp vor der maturen microRNA liegen (Zhou et al., 2007).

Addiert man diese 1000bp zu den etwa 600bp der Größe eines Kernpromotors, so ist der von uns gewählte 2000bp große 5'-Bereich umfangreich genug. Ferner wurde von Lister et al. festgestellt, dass die Dichte von mCG's (methylierten CpG-Dinukleotiden) im Bereich von bis zu 2000bp vor der TSS zunahm (Lister et al., 2009).

Mehrere Versuche wurden unternommen, um microRNA-Promotoren *in silico* zu identifizieren. Hierbei wurden Programme verwendet, die auch bereits validierte mRNA-Promotoren aufgefunden hatten. Hierbei wurden regulatorische Elemente entdeckt, die denen von mRNA-Promotoren entsprachen (Zhou et al., 2007), (Saini et al., 2007). Megraw et al. berichteten, dass 70% aller microRNAs einen single-peak-TSS Promotor aufweisen (Megraw et al., 2009).

5.1.3 Methylierung von microRNAs im HCC in der Literatur

Es existieren außer dieser Arbeit nur zwei Publikationen (Stand: März 2010), die die Methylierung von microRNA-Genen im hepatozellulären Karzinom untersuchen.

1. Hsa-mir-1

In der ersten dieser Publikationen wurde, ähnlich wie bei unseren Analysen, von Datta et al. ein Zusammenhang zwischen Methylierung und Expression von Hsa-mir-1 in Zelllinien festgestellt. Drei der sechs von Datta et al. überprüften Tumor- und Normalgewebepaare zeigten eine deutlich höhere Expression im Normalgewebe, obwohl laut deren statistischer Auswertung fünf von sechs Proben eine höhere Expression aufweisen sollten. Interessant ist hierbei, dass diese Normalgewebeproben nicht wie die Tumoren in der Methylierungsmessung nummeriert sind. Es kann sich somit um völlig andere Proben handeln, die zudem auch nicht differentiell methyliert sein müssen. Da diese unvollständig publizierten Daten zweifelhaft sind, konnte somit der von Datta et

al. postulierte Zusammenhang zwischen Methylierung und Expression *in vivo* in den von uns untersuchten Fällen widerlegt werden (Datta et al., 2008).

Basierend auf einer COBRA-Analyse in HCC-Zelllinien der mit Hsa-mir-1-1 assoziierten CpG-Insel #81 wurden von Datta et al. die ersten Methylierungsdaten gesammelt. Hierzu wurden die Restriktionsenzyme TaqI und Acil verwendet. Acil hat die Erkennungssequenz 5'-CCGC-3' die nach erfolgter Konversion und iPCR, je nach Methylierungsgrad, folgendermaßen aussieht: 5'-TYGT-3'. Die Untersuchung mit diesem Enzym in einer COBRA gibt keinen Aufschluss über die Methylierung dieser Sequenz, da Acil die konvertierte DNA-Sequenz nicht erkennen kann (<http://www.neb.com/>). Alle Daten aus dieser Analyse, die Methylierungen zeigen, sind somit falsch-positiv, da wenn überhaupt nur unvollständig konvertierte DNA geschnitten werden kann (Datta et al., 2008).

Von den untersuchten vier Tumor- und Normalgewebepaaren sollen drei Tumore laut Publikation schwach signifikant hypermethyliert sein. Eines dieser drei Tumor-Normalgewebepaare zeigt gerade einmal einen Schatten einer Bande bei TaqI, die anderen beiden angeblich methylierten Proben zeigen nur schwache Restriktionsfragmentbanden. Der von Datta et al. beobachtete Methylierungsgrad, der sich in der Bandenintensität der Restriktionsfragmente widerspiegelt (Datta et al., 2008, Abbildung 2B), ist somit nach unseren Maßstäben sehr gering.

Die danach vorgenommene Bisulfitsequenzierung zeigte einen unmethylierten Bereich in der CpG-Insel #81, der von zwei hypermethylierten Regionen flankiert wurde. Laut Methylierungsdaten von Straussman et al. ist die CpG-Insel #81 in 3/3 gesunden Leberproben unmethyliert, was diese CpG-Insel zur besten Kandidatin für die Suche nach aberranten Methylierungsereignissen macht. Datta et al. gaben an, dass die anderen von ihnen untersuchten CpG-Inseln in allen Fällen ihrer Untersuchungsreihe unmethyliert gewesen seien. Aus der Publikation von Straussman et al. geht jedoch hervor, dass zwei dieser CpG-Inseln (CGI #18 und #26) in allen drei untersuchten Fällen gesunder Leber deutlich methyliert waren (Straussman et al., 2009). Es zeigte sich somit insgesamt, dass beide Probenkollektive (Datta et al., n=4 und Straussman et al., n=3) zu klein waren, um eindeutige Aussagen zu formulieren (Datta et al., 2008).

2. Hsa-mir-124

Die Gruppe von Furuta et al. konnte als Zweite Methylierungsdaten aus dem HCC präsentieren. Sie beschrieben neben der Hsa-mir-124-Familie auch die Hypermethylierung der microRNAs Hsa-mir-9-1, Hsa-mir-9-3 und Hsa-mir-596 in großen Teilen der 19 untersuchten HCC-Zelllinien, konnten aber hierbei keinen Zusammenhang zwischen Methylierung und Expression feststellen (Furuta et al., 2009).

Sie berichteten von einer gelegentlichen tumorspezifischen Methylierung von Hsa-mir-124-1: 26,1% (6/23 Fällen) und Hsa-mir-124-2: 30,4% (7/23 Fällen) sowie einer häufigen Hypermethylierung von Hsa-mir-124-3: 82,6% (19/23 Fällen) in HCC-Primärtumoren mittels COBRA. Sie beschreiben des Weiteren einige Fälle von Hypermethylierung im angrenzenden Normalgewebe (Furuta et al., 2009).

Eine nähere Betrachtung dieser Daten zeigte jedoch, dass die meisten als hypermethyliert gewerteten COBRA-Ergebnisse auf sehr schwachen Restriktionsfragmentbanden basierten. Nach unseren Kriterien wären diese Fälle als schwach bis gar nicht methyliert eingestuft worden. Hierbei zeigte sich eine Parallele zu der Publikation von Datta et al., die schwache Banden als Indikatoren für eine signifikante Hypermethylierung gewertet haben (Furuta et al., 2009).

Darüber hinaus waren die Zahlenreihen der COBRA-Gelkontrollen unterbrochen, was den Anschein erweckt, dass selektiv Daten ausgelassen wurden. Diese Vermutung wurde bekräftigt, indem das Auftreten von Restriktionsfragmenten bei der COBRA-Analyse von umgebendem, nicht-neoplastischem Normalgewebe erwähnt wurde. Deutliche Methylierungsunterschiede zeigten sich nur bei Hsa-mir-124-3. Die durch Furuta et al. untersuchten cis-regulatorischen Regionen von insgesamt nur 39 microRNAs umfassten lediglich 500bp der 5'-Region der muren microRNA, während wir einen Kontext von 2000bp in 68 CpG-Insel assoziierten microRNAs analysiert haben. Auch bei den Expressionsdaten wurde eingeräumt, dass bei immerhin 25% der Fälle von Hsa-mir-124 die Expression auch in unmethylierten Tumoren geringer als im angrenzenden Normalgewebe war, was eher für eine methylierungsunabhängige, tumorspezifische Herunterregulierung als für eine epigenetische Regulation spricht (Furuta et al., 2009).

5.1.4 Qualitative Methylierungsanalyse (MSP)

Die von unserer Seite aufgrund ihrer einfachen Durchführbarkeit als Schnelltest eingesetzten MSP-Analysen lieferten keine zusätzlichen Kandidaten zu denen aus der COBRA, da insgesamt keine deutlich stärker im Tumor oder im Normalgewebe methylierte microRNA entdeckt wurde. Es wurden initial nur Teile der untersuchten Kohorten mittels MSP der microRNAs Hsa-mir-9-3, Hsa-mir-34a, Hsa-mir-124-1 und Hsa-mir-124-3 analysiert. Da jedoch hierbei keine ausgeprägten Kandidaten entdeckt wurden, ist die MSP als Methode zur Methylierungsanalyse nicht weiter verwendet worden. Aufgrund der Tatsache, dass die Aussagekraft der MSP im Vergleich zur quantitativen Analyse fraglich ist, wie im Folgenden erläutert wird, wurden dieselben Fälle aus der MSP-Analyse nochmals mittels Pyrosequenzierung untersucht.

Die Sensitivität der MSP ist ein entscheidendes Kriterium, mit großem Einfluss auf deren Resultate, das aber häufig nicht oder nur unzureichend diskutiert wird. Da zwei Primerpaare mit methylierungsspezifischen Sequenzen verwendet werden, muss man von zwei unterschiedlichen Effizienzen bei der Produktamplifikation ausgehen, die einen direkten Einfluss auf die Quantifizierung und somit auf die Beurteilung der Methylierung haben. Hierbei werden die Bandenintensitäten der PCR-Produkte der Primerpaare für unmethylierte (U) und methylierte (M) DNA miteinander verglichen. Ist das M-Primerpaar beispielsweise geeignet zur Amplifikation kleinster Mengen an methylierter DNA, so ist die irrtümliche Beurteilung einer Probe als stark methyliert leicht möglich, da auch bei schwach methylierten Proben eine starke Bande des M-Primerpaares detektiert werden kann. Daher ist es einleuchtend, dass eine gestufte Einteilung in unterschiedliche Methylierungsgrade oder die Definition eines Schwellenwertes nicht möglich sind.

5.1.5 Semiquantitative Methylierungsanalysen (COBRA und qRT-MSP)

In einer initialen Untersuchung der Methylierung von CpG-Insel-assoziierten microRNAs in den drei HCC-Zelllinien Huh-7, HLE und HLF sowie einer Probe gesunder Leber eines 52 Jahre alten Spenders wurden zwölf differentiell methylierte microRNAs entdeckt. Die gemessenen Methylierungsunterschiede bei diesen microRNAs waren überwiegend sehr stark, wobei in 10/12 Fällen (83%) keine oder nur eine schwache

Methylierung im Normalgewebe und eine starke Methylierung in den HCC-Zelllinien gemessen wurde.

Bei den microRNAs Hsa-mir-92b und Hsa-mir-193b wurde im Gegensatz zu den anderen Kandidaten eine starke Methylierung im Normalgewebe und nur eine schwache Methylierung in den HCC-Zelllinien gemessen. Nach weiteren Untersuchungen von Hsa-mir-92b und Hsa-mir-193b in Primärtumoren und angrenzendem Normalgewebe zeigte sich jedoch, dass Hsa-mir-92b in den Tumoren etwas stärker als im Normalgewebe und Hsa-mir-193b gleichermaßen stark in Tumoren und Normalgewebe methyliert war. Somit schieden diese beiden Kandidaten aus.

Nach einer Analyse der Methylierung in HCC Primärtumoren, HCC-Primärtumoren von Siderosepatienten und gesunder Leber waren noch fünf microRNA-Kandidaten: Hsa-mir-9-1, Hsa-mir-203, Hsa-mir-572, Hsa-mir-596 und Hsa-mir-663 zu verzeichnen. Bei den übrigen microRNAs waren nur geringe Unterschiede der Methylierung von Tumor- und Normalgewebe festgestellt worden, weshalb diese nicht weiter untersucht wurden.

Als das untersuchte Patientenkollektiv auf 31 HCC-Primärtumore mit angrenzendem Normalgewebe ausgedehnt wurde, konnten nur noch drei microRNAs als differentiell methyliert klassifiziert werden: Hsa-mir-9-1 (in 68% der Fälle hypermethyliert), Hsa-mir-596 (in 39% der Fälle hypermethyliert) und Hsa-mir-663 (in 58% der Fälle hypermethyliert). Auffällig war hierbei, dass die beobachtete differentielle Methylierung von Hsa-mir-203 und Hsa-mir-572 nur sehr schwach ausgeprägt war und diese microRNAs daher nicht länger als Kandidaten betrachtet wurden. Die drei microRNA-Kandidaten, die am Ende der COBRA-Untersuchungen verblieben, wurden darauf hin nochmals durch Pyrosequenzierung untersucht.

Die quantitative Real Time-MSP wurde als Alternative zur Pyrosequenzierung eingesetzt, da kein Pyrosequenzierungsassay für die microRNAs Hsa-mir-34b/c etabliert werden konnte. Dennoch sind diese beiden Methoden in ihrer Aussagekraft nicht gleichzusetzen, da die qRT-MSP nur eine semiquantitative Analyse darstellt. Dennoch können im Gegensatz zur MSP sowohl ein Schwellenwert wie auch vereinfachende Abstufungen des Methylierungsgrades definiert werden.

Die häufig gemessene Hypermethylierung von HCC-Primärtumoren (in 34% der Fälle) zeigt, unabhängig von einer statistischen Verifikation oder Falsifikation, dass die microRNAs Hsa-mir-34b/c im HCC aberrant hypermethyliert sein können. Dies ist eine interessante Beobachtung, die im Gegensatz zu der Entdeckung steht, dass Hsa-mir-34a laut Pyrosequenzierung im HCC schwach hypomethyliert beziehungsweise unmethyliert ist. Da in vielen Publikationen und auch bei der *in silico* Analyse der mi-

croRNA-Familie Hsa-mir-34 Parallelitäten zwischen den einzelnen Mitgliedern sowohl auf regulatorischer als auch auf funktionaler Ebene auftraten, ist dies ein Hinweis auf eine gesonderte Funktion von Hsa-mir-34a und den gemeinsam exprimierten microRNAs Hsa-mir-34b/c (Hermeking, 2010).

Auffällig ist jedoch, dass keine häufig auftretende Hypermethylierung in FLC's gemessen wurde, die bei den anderen stark differentiell methylierten microRNA-Kandidaten beobachtet wurde. Dies scheint ein Indiz dafür zu sein, dass hierbei die Grenzen der Auflösung der qRT-MSP erreicht wurden oder die untersuchte Kohorte von n=17 Fällen zu klein war.

Dennoch sind die beiden microRNAs Hsa-mir-34b und Hsa-mir-34c gerade aufgrund dieser unterschiedlichen Daten mögliche Kandidaten für zukünftige, weiterführende Analysen.

5.1.6 Quantitative Methylierungsanalyse (Pyrosequenzierung)

Mit Hilfe dieser hochauflösenden Methode zur Methylierungsmessung einzelner CpG-Dinukleotide wurde ein umfassendes Methylierungsprofil des HCC und dessen präneoplastischen Vorstufen erstellt, das kritisch und stringent auf Hypermethylierungsereignisse überprüft wurde. Vorab sollte ein Schwellenwert definiert werden, ab dem eine Probe anhand der gemessenen prozentualen Daten als methyliert bezeichnet werden kann.

Laut einer Publikation von Gao et al. wurde eine Methylierung von 12% als die minimale Grenze für per definitionem methylierte Proben beschrieben (Gao et al., 2008). Wir haben diese Formel um die differentielle Methylierung von Tumor und angrenzendem Normalgewebe erweitert und damit den Gesamtschwellenwert weiter erhöht. Vor allem aber wurde durch diese Erweiterung eine differenziertere Basis geschaffen, von der aus Hypermethylierungsereignisse sowohl im Tumor als auch im Normalgewebe entdeckt und weiter evaluiert werden können. Zu diesem Zweck wurden die Daten schließlich statistisch auf ihre Signifikanz überprüft, um nur signifikant hypermethylierte Fälle in die finale Auswertung mit einzubeziehen.

Betrachtet man die als hypermethyliert berechneten Einzelfälle vor und nach der Signifikanzanalyse, so fällt eine Erhöhung der Stringenz nach der Signifikanzanalyse auf, da nicht alle hypermethylierten Fälle auch statistisch signifikant waren. Je nach Streuung der Daten waren im Schnitt 40% der Fälle nicht signifikant hypermethyliert. Nimmt man

die beiden schwach methylierten microRNAs Hsa-mir-148a und Hsa-mir-34a heraus, so fällt dieser Wert auf 32%. Dennoch ist somit etwa $\frac{1}{3}$ der hypermethylierten Daten aus der finalen Betrachtung heraus gefallen, was ein weiterer Beweis für die stark erhöhte Stringenz der von uns verwendeten Kriterien ist. Die Methylierungsdaten von Hsa-mir-34b/c, die im HCC häufig hypermethyliert ist, konnten nicht auf ihre Signifikanz hin überprüft werden, da keine quantitative Analyse möglich war.

Bei einer von Arai et al. durchgeführten globalen Methylierungsanalyse in der Leber zeigten 17/25 (68%) BAC Klone in der gesunden Leber eine stärkere Methylierung als in angrenzendem, nicht neoplastischen Lebergewebe. Dies kann auf einen Nebeneffekt der globalen Demethylierung in der Entstehung des HCC zurückzuführen sein (Arai et al., 2009). Dieser Effekt wurde auch von Lujambio et Esteller beschrieben, die wie andere auch postulierten, dass die globale Methylierung des Genoms in der Karzinogenese abnimmt (Lujambio and Esteller, 2009). Dies könnte eine Erklärung für die von uns bei 7/11 (64%) microRNAs beobachtete, schwächere Methylierung im angrenzenden nicht-neoplastischen Normalgewebe im Vergleich mit gesunder Leber darstellen.

Lin et al. berichteten in vergleichbarer Weise, dass sie keinen signifikanten Unterschied in der globalen Methylierung von gesunder Leber und Leberzirrhose feststellen konnten. Sie beschrieben des Weiteren aberrante Methylierungen von mehreren genomischen Loci in Zirrhose und Hepatitis, wobei die aberrante Methylierung als eines der frühesten molekularen Ereignisse in der Hepatokarzinogenese und dem Progress des HCC aufgeführt wird ist. Sie konnten außerdem ableiten, dass die Wahrscheinlichkeit der HCC-Entstehung bei zirrhotischen Fällen größer als bei chronischer Hepatitis ist (Lin et al., 2001).

Ein weiterer Effekt, der unterschiedliche Methylierungswerte hervorrufen kann, ist die Untersuchung unterschiedlich fixierter und konservierter Probenarten. Bei unseren Untersuchungen wurde festgestellt, dass die DNA aus FFPE-Material einen höheren Methylierungsgrad als DNA des gleichen Patienten aus kryoasserviertem Frischmaterial aufwies. Dieser Unterschied war zwar nicht signifikant, aber durchaus messbar. Daher ist es, wenn möglich, am sinnvollsten, nur Proben gleicher Materialart miteinander zu vergleichen.

5.1.6.1 Statistische Analyse der microRNA-Methylierungsdaten

Die microRNA Hsa-mir-1-1 wurde von Datta et al. als im HCC differentiell methyliert und exprimiert beschrieben (Datta et al., 2008). Unsere weit umfangreichere, quantitative Analyse lieferte jedoch ein anderes Bild. Ein signifikanter Unterschied der Methylierung von HCC-Primärtumoren und angrenzendem Normalgewebe konnte bei jungen HCC-Patienten unter 40 Jahren beobachtet werden, bei älteren HCC-Patienten war dieser Unterschied schwächer. Die von uns in gesunder Leber gemessene Methylierung unterschied sich nicht signifikant zu der in Zirrhose und den meisten HCC-Primärtumoren. Dieser Vergleich ist bei Datta et al. nicht möglich, da in dieser Studie kein gesundes Lebergewebe oder Zirrhosen untersucht wurden. Die Analyse der Methylierung in HCC-Zelllinien zeigte bei Hsa-mir-1-1 eine unterdurchschnittlich starke Methylierung von 17% ($\bar{x}=41\%$). Bei der Untersuchung der Methylierung von Zirrhose und gesunder Leber zeigte sich nur ein schwach signifikant hypermethylierter Fall, der zu einem Patienten (LE14) mit leichter Steatose gehörte. Es waren zwar 35% der HCC-Primärtumore verglichen mit ihrem angrenzenden Normalgewebe signifikant hypermethyliert, insgesamt ist jedoch die differentielle Methylierung im HCC durchschnittlich nur 4% höher als im angrenzenden Normalgewebe, weshalb Hsa-mir-1-1 in dieser Arbeit nur als schwacher Kandidat gewertet werden kann.

Bei der Untersuchung der Hsa-mir-9-Familie, die in einer früheren Untersuchung unserer Arbeitsgruppe als im Mamma-Karzinom hypermethyliert beschrieben wurde (Lehmann et al., 2008), zeigte sich zunächst eine in der vorangegangenen COBRA ermittelte, tumorspezifisch differentielle Methylierung im HCC und dessen angrenzenden Normalgewebe.

In der folgenden Pyrosequenzierung fielen in erster Linie statistisch signifikante Methylierungsunterschiede in HCC's, FLC's, FNH's und Zirrhose bei Hsa-mir-9-1 auf. Interessanterweise waren die Unterschiede im FLC bei allen drei Mitgliedern der Hsa-mir-9-Familie signifikant. Im HCC war dies nur bei Hsa-mir-9-1 der Fall, die in Hsa-mir-9-2 und Hsa-mir-9-3 gemessene höhere Streuung der Datenwerte könnte jedoch den Verlust der Signifikanz verursacht haben. Die bei Hsa-mir-9-2 in gesunder Leber in Relation zu kindlicher HC gemessene signifikante Hypermethylierung kann aufgrund des Alterseffektes aufgetreten sein, da die Methylierungsdifferenz zu älteren Siderose- oder Zirrhosefällen nicht signifikant und die Streuung der Werte in diesen Gruppen vergleichbar ist. In allen untersuchten HCC-Zelllinien war Hsa-mir-9 überdurchschnittlich

(\bar{x} =41%) stark methyliert (Hsa-mir-9-1: 56%; Hsa-mir-9-2: 62%; Hsa-mir-9-3: 53%), lediglich Hsa-mir-9-3 war in HLE und HLF nur schwach (6%) methyliert. Da diese beiden Zelllinien jedoch aus demselben Patienten stammen (♂, 68 Jahre: HLE= epithelial, HLF=fibroblastisch) ist diese Parallelität nicht unwahrscheinlich. Ob diese schwache Methylierung auch einen funktionalen Charakter hat, ist jedoch fraglich, da die anderen beiden Loci von Hsa-mir-9 gleichermaßen stark in allen Zelllinien methyliert sind.

Auffällig ist, dass bei den microRNA-Kandidaten Hsa-mir-9 und Hsa-mir-663 ein vergleichbares Hypermethylierungsprofil in HCC's und FLC's beobachtet wurde. Die beiden statistisch signifikanten Ausreißer von Hsa-mir-9-3 in gesunder Leber (LE8: NASH und mäßige Statose) und Zirrhose (CIR6: Komplette Zirrhose bei Hepatitis B) fallen jedoch nur unwesentlich ins Gewicht, da beide Fälle schwächer als der Mittelwert der Tumore methyliert sind. Die durchschnittliche Methylierung des Tumorgewebes von Hsa-mir-9-1 lag 11%, die von Hsa-mir-9-2 und Hsa-mir-9-3 4% beziehungsweise 6% höher als im angrenzenden Normalgewebe. Insgesamt waren 42% aller Tumore in Hsa-mir-9-1, 29% in Hsa-mir-9-2 und 30% in Hsa-mir-9-3 signifikant hypermethyliert, was den Schluss zulässt, dass die Hsa-mir-9-Familie, neben ihrer bewiesenen epigenetischen Inaktivierung im Brustkrebs, auch in der Hepatokarzinogenese aberrant hypermethyliert sein kann.

Die mittlere Methylierung von Hsa-mir-34a lag in den Tumor- und Normalgewebeproben bei jeweils nur 3% sowie in gesunder Leber bei 9% und somit unterhalb des von uns definierten Schwellenwertes. In Huh-7 und HepG2 war Hsa-mir-34a so gut wie gar nicht (4%) methyliert, in HLE und HLF (24%) dagegen relativ stark. Auch hier weist das ähnliche Methylierungsmuster auf den Ursprung der beiden Zelllinien aus dem selben Patienten hin. Da nur eine einzige hypermethylierte Probe (HCC31: Ethyltoxische Zirrhose mit Hepatitis; 19% Methylierung) in den Tumor- und Normalgewebeproben ermittelt wurde, könnte hier von einem Ausreißer gesprochen werden. Andererseits zeigt HCC31 einen *CpG-Island Methylator Phenotype* (CIMP), da dieser Fall in mehreren Genen hypermethylierte Tumore aufweist (Kapitel 5.1.7.1). Hsa-mir-34a ist daher anhand unserer Daten nicht weiter als Kandidat betrachtet worden.

Die Hsa-mir-124-Familie zeigte ein insgesamt heterogenes Bild in ihrer Methylierung. Es wurden nur vereinzelt signifikante differentielle Methylierungsereignisse festgestellt. Eine schwach signifikante Hypermethylierung wurde bei Hsa-mir-124-1 in gesunder Leber vs. Zirrhose, bei Hsa-mir-124-2 in HCC-Primärtumoren von Patienten <40 Jahren und bei Hsa-mir-124-3 in HCC-Primärtumoren von Patienten >40 Jahren ermittelt.

Die Methylierung in HCC-Zelllinien stieg von Hsa-mir-124-1 (21%) über Hsa-mir-124-2 (34%) bis Hsa-mir-124-3 (50%) stetig an. Es waren insgesamt auch nur relativ wenige Tumore signifikant hypermethyliert: 23% bei Hsa-mir-124-1, 6% bei Hsa-mir-124-1 und 16% bei Hsa-mir-124-3. Die untersuchten Normalgewebe zeigten keine signifikant hypermethylierten Fälle.

Es ist festzuhalten, dass bei Hsa-mir-124-3 42% der HCC-Primärtumore aus Patienten >40 Jahren signifikant hypermethyliert waren. Die durchschnittliche Methylierung im HCC war jedoch mit 5% nur geringfügig höher als im angrenzenden Normalgewebe, weshalb diese microRNA zwar die interessanteste ihrer Familie, jedoch insgesamt auch nur ein schwacher Kandidat ist.

Bei der Untersuchung der microRNA Hsa-mir-148a zeigte sich ähnlich wie bei Hsa-mir-34a eine leicht ansteigende Methylierung von HCC-Primärtumoren zu gesunder Leber, die jedoch nicht signifikant war. Hierbei könnte es sich um ein Artefakt handeln, das durch zwei nicht signifikante Ausreißerwerte in gesunder Leber (LE2: minimale Steatose, LE9: geringe Fibrose, mittlere Steatose), oder die unterschiedlichen Probenarten (gesunde Leber: FFPE, HCC+LNG: Kryomaterial) verursacht wurde.

In den Zelllinien HLE und HLF war Hsa-148a mit 42% stark methyliert, in den Zelllinien Huh-7 und HepG2 mit 5% jedoch so gut wie nicht methyliert. Es wurde nur ein signifikanter Fall hypermethylierten Normalgewebes (HCC19: 10%) in HCC-Patienten >40 Jahren und ein hypermethylierter Tumor (HCC5: 16%) bei HCC-Patienten <40 Jahren entdeckt, die jedoch beide eine immer noch niedrige Methylierung aufweisen. Die mittlere Methylierung aller Fälle lag bei 8% in gesunder Leber und bei 3% in HCC-Primärtumoren, weshalb eindeutig kein differenzielle Methylierung vorliegt, da diese Werte unterhalb des von uns definierten Schwellenwertes lagen. In den nicht-neoplastischen Geweben waren keine signifikant hypermethylierten Fälle ermittelt worden. Hsa-mir-148a ist somit eine durch die Hepatokarzinogenese auf epigenetischer Ebene unbeeinflusste microRNA.

Die aus der COBRA als Kandidat hervorgegangene microRNA Hsa-mir-596 zeigte eine in HCC-Primärtumoren stärkere, jedoch nicht signifikante Methylierung als im Normalgewebe. Hsa-mir-596 war jedoch in allen Zelllinien bis auf HepG2 (28%) überdurchschnittlich stark (64%) methyliert. Insgesamt waren 23% aller Tumore signifikant hypermethyliert, wobei dieser Anteil bei jungen HCC-Patienten <40 Jahren auf 40% (2/5) anstieg. In den nicht-neoplastischen Proben sind keine signifikant hypermethylierten Fälle ermittelt worden. Die durchschnittliche Methylierung im HCC war mit 6% nur et-

was höher als im angrenzenden Normalgewebe, womit die microRNA Hsa-mir-596 zu den schwachen Kandidaten dieser Analyse gezählt werden kann.

Die letzte untersuchte microRNA, Hsa-mir-663, gehört mit Hsa-mir-9 zu den starken Kandidaten dieser Arbeit. Sie war ebenso wie Hsa-mir-9 bereits von unserer Arbeitsgruppe im Mammakarzinom als hypermethyliert beschrieben worden (Lehmann et al., 2008).

Die bei Hsa-mir-663 beobachtete, signifikante differentielle Methylierung der HCC-Primärtumoren von Patienten aller Altersgruppen ging einher mit einer signifikanten Hypermethylierung von FLC's. Diese Signifikanz konnte bei der Gruppe von HCC-Primärtumoren ohne Zirrhose nicht beobachtet werden, was jedoch an der Streuung der Daten lag, da hier trotzdem 50% der einzelnen Fälle signifikant hypermethyliert waren. Auffällig bei dieser microRNA ist ein signifikanter Unterschied zwischen der Methylierung von gesunder Leber sowie Zirrhose, die beide deutlich stärker methyliert sind als kindliche Hämochromatose. Dieser Unterschied kann zum Einen am bereits zuvor diskutierten Alterseffekt liegen, der bei Säuglingen noch nicht zur Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen geführt hat, und zum Anderen an unterschiedlichen Nukleinsäurequalitäten, die einen Einfluss auf die Pyrosequenzierungsergebnisse haben können. Letztlich zeigte sich aber, dass das Gros der gesunden Leberproben und auch der Zirrhosefälle eine geringere Methylierung als die hypermethylierten Tumorproben aufweist und lediglich vier Ausreißer (LE4 und LE14: beide leichte Steatose sowie CIR10 und CIR13) zu dieser hohen Abweichung führen. Hsa-mir-663 ist in allen untersuchten Zelllinien (82%) weit überdurchschnittlich stark methyliert. Die geringe Methylierung von 7% in Lymphozyten zeigt, dass diese starke Methylierung gewebespezifisch ist und mit hoher Wahrscheinlichkeit eine tumorspezifische aberrante Modifikation darstellt.

Betrachtet man zunächst die signifikant hypermethylierten Tumorproben, so fällt hierbei auf, dass 31% aller Tumore bei Hsa-mir-663 hypermethyliert sind. Den größten Anteil haben hierbei die HCC-Primärtumore von Patienten <40 Jahren, von denen 62% signifikant hypermethyliert sind. An zweiter Stelle stehen die HCC's ohne Zirrhose, von denen immerhin noch 50% signifikant hypermethyliert sind. In den untersuchten, nicht-neoplastischen Geweben war nur eine einzige Probe (HCHF4: Siderose mit Steatose und Fibrose) signifikant hypermethyliert. Das entscheidende hierbei ist, dass keine signifikante Hypermethylierung einer einzelnen Probe in der gesunden Leber oder in Zirrhose (siehe oben) ermittelt wurde, da dies den Ausnahmecharakter dieser hypermethylierten Fälle untermauert. Schließlich kann festgehalten werden, dass Hsa-mir-663, deren durchschnittliche Methylierung im Tumorgewebe 10% stärker ist als im an-

grenzenden Lebernorgangewebe, eine im hepatozellulären Karzinom signifikant hypermethylierte microRNA darstellt, deren epigenetische Inaktivierung im Mammakarzinom bereits von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte.

Da die stärksten microRNA-Kandidaten aus dieser Arbeit, Hsa-mir-9-1 und Hsa-mir-663 sowohl im Mammakarzinom als auch im HCC signifikant hypermethyliert sind, kann also vermutet werden, dass Hsa-mir-9-1 und Hsa-mir-663 eine putative Tumorsuppressorfunktion erfüllen. Hierbei ist jedoch noch offen, inwieweit die schwächere aber immer noch signifikante differentielle Methylierung von Hsa-mir-9-2 und Hsa-mir-9-3 einen funktionalen Einfluss auf die epigenetische Regulation dieser microRNA-Familie hat.

5.1.7 Korrelationsanalysen ätiologisch relevanter Faktoren

5.1.7.1 CpG-Insel Methylierungs Phänotypen (CIMP) und Alterseffekt

Da festgestellt wurde, dass viele Fälle nicht nur in einer microRNA signifikant hypermethylierte Tumore aufweisen, wurde ermittelt, welche Fälle in mehreren Genen Hypermethylierungen zeigen. Gleichzeitig wurden die archivierten Diagnosedaten und die pathologische Reevaluation der Gewebeschnitte betrachtet, um Korrelationen zwischen mehreren Faktoren zu ermitteln.

Ein CIMP kann durch die erhöhte Expression von DNA-Methyltransferasen auftreten (Peng et al., 2006), die durch den Tumorsuppressor p53 in Zelllinien von Kolonkarzinomen reguliert werden können (Peterson et al., 2003). Die Regulation *in vivo* ist immer noch umstritten.

CIMP's können als Folge sowohl von aberranter *de novo* Methylierung (methylierungsunabhängig) bestimmter Gene als auch durch die Verstärkung bestehender Methylierung (methylierungsabhängig) entstehen (Teodoridis et al., 2008). Der letztere Effekt konnte bei Hsa-mir-663 beobachtet werden, die schon in gesunder Leber eine relativ hohe Methylierung aufwies.

Seit deren Entdeckung wurden unterschiedliche Sequenzen zur Identifikation von CIMP's verwendet, wobei in den meisten Fällen mehrere Sequenzen der MINT-Familie untersucht wurden (Toyota et al., 1999). Anhand dieser Methylierungsanalysen wurden

CIMPs in Magenkarzinomen, Lungenkarzinomen, Leberzellkarzinomen, Ovarialkarzinomen und Leukämien entdeckt. Ein CIMP ist somit nicht auf bestimmte Tumortypen beschränkt; die übereinstimmende, aberrante Methylierung kann vielmehr ein generelles Phänomen im Krebs darstellen, in das mehrere verschiedene Gene je nach Tumorart involviert sein können. Die Anzahl der hypermethylierten Gene variierte in den bisherigen Studien von meist ≥ 2 - ≥ 4 Genen (Teodoridis et al., 2008).

Wir haben uns für den oberen Schwellenwert von ≥ 4 hypermethylierten Genen je Fall entschieden, da dies mehr als 33% der von uns untersuchten microRNAs entspricht und somit von einem häufigen Auftreten von Hypermethylierungen gesprochen werden kann. Weiterhin wurden elf microRNAs als Datenset zur Definition des CIMP verwendet, da wir die ursprünglich von Toyota et al. ausgewählten Gene nicht untersucht haben.

Neben der Analyse der Methylierung von microRNAs wird von uns zur Zeit auch die Methylierung anderer Gene, wie beispielsweise GSTP1, RASSF1A, LINE1 und MINT31 betrachtet, um ein alternatives Datenset zur Definition des CIMP auf signifikante Korrelationen mit ätiologischen Faktoren zu überprüfen.

Shen et al. demonstrierten, dass acht Gene und CpG-Inseln in Tumoren von Patienten mit Hepatitis oder Leberzirrhose aus Risikoländern stärker methyliert sind, als spontan entstandene Tumore (Shen et al., 2002).

In unserer Analyse zeigten sich jedoch keine signifikanten Korrelationen von CIMP und Zirrhose, Hepatitis, Alter oder Geschlecht.

Arai et al. konnten keine signifikanten Unterschiede der Methylierungsprofile von Männern und Frauen entdecken, was unserer Beobachtung entspricht. Sie konnten ebenso zeigen, dass sowohl mehr Hypo- als auch mehr Hypermethylierungen in den untersuchten Tumoren im Vergleich zu deren angrenzenden Normalgeweben auftraten, was eine generelle, aberrante Methylierung in Neoplasien akzentuiert. (Arai et al., 2009).

Eine generelle Schwierigkeit besteht dessen ungeachtet in der Qualität der archivierten histologischen Diagnosen, die leider nicht vollständig sind. Ein Beispiel hierfür sei die HBV-Infektion. Da nicht bei allen Fällen explizit vermerkt ist, ob diese HBV-positiv oder HBV negativ sind, ist die vorliegende Tabelle 56 nur als unvollständig anzusehen.

Der ebenfalls diskutierte Alterseffekt, der in diesem Kontext als Ursache der zunehmenden Hypermethylierung von bestimmten Genen vermutet wurde, ist statistisch ebenfalls nicht signifikant.

5.2 Promotoranalysen von CpG-Insel assoziierten microRNAs

5.2.1 5'-RACE und Nested cDNA-PCR von Hsa-mir-9-1

Neben der Promotoranalyse von proteincodierenden Genen wurde die 5'-RACE auch schon zur Analyse von microRNA-Promotoren verwendet. Fukao et al. beschrieben die Entdeckung eines konservierten Promotors der microRNA Hsa-mir-223 (Fukao et al., 2007).

Nachdem die ersten Versuche der 5'-RACE keine auswertbaren Resultate geliefert hatten, wurde nach einer Alternative gesucht, die in Form der Nested cDNA-PCR umgesetzt wurde.

Die Identifizierung von microRNA-Primärtranskripten über die Analyse von EST-flankierenden Sequenzen wurde 2006 von Gu et al. in *M. musculus* beschrieben (Gu et al., 2006). Demzufolge war es nahe liegend, bei der Analyse von Hsa-mir-9-1 die ersten PCR-Primer für das größte Primärtranskript von 1166bp auf die Precursor-microRNA und das in 5'-Richtung liegende EST-Exon #1 zu legen. In dieser PCR konnte jedoch kein Produkt amplifiziert werden.

Schließlich wurde über die Nested-PCR neben einem 167bp langen Fragment aus der cDNA der Zelllinien Huh-7, HLE, HLF und HepG2 ein 354bp langes Teilstück des Primärtranskripts in HLE und HLF entdeckt, das anhand unserer Daten auf ein Primärtranskript der microRNA Hsa-mir-9-1 von mindestens 354bp, aber definitiv weniger als 1166bp schließen ließ.

Zeitgleich zu diesen Erkenntnissen wurde jedoch von Lujambio et al. (Lujambio et al., 2008) die Entdeckung eines 442bp langen Primärtranskripts publiziert. Dieses Transkript konnte im Zuge unserer Wiederholung der 5'-RACE mit den neu entwickelten Primern nach der *in silico* Reevaluation der Promotorstruktur von Hsa-mir-9-1 reproduziert werden. Obwohl unsere eigenen RACE-Primer kein auswertbares Resultat lieferten, so bewies dennoch die Existenz des 442bp langen Transkripts von Lujambio et al., das in zwei voneinander unabhängigen Studien reproduziert werden konnte, dass das von uns entdeckte, 354bp lange Fragment 80% der Sequenz der PrimicroRNA von Hsa-mir-9-1 ausmacht.

5.3 Expressionsanalyse von CpG-Insel assoziierten microRNAs

In einer Studie von Landgraf et al. wurden die am stärksten exprimierten humanen microRNAs ermittelt. Die microRNA-Familien Hsa-mir-9 (12/26) und Hsa-mir-124 (18/26) gehörten zu den 26 am stärksten exprimierten microRNAs im menschlichen Organismus. In der Leber gehörten die microRNAs Hsa-mir-9 (6/17), Hsa-mir-148a (12/17) und Hsa-mir-34a (15/17) zu den 17 am stärksten exprimierten microRNAs (Landgraf et al., 2007). Eine Herunterregulation der microRNA Hsa-mir-124 im HCC wurde von Huang et al. beschrieben (Huang et al., 2009). Navon et al. berichteten von einer starken Expression von Hsa-mir-1 und Hsa-mir-663 im HCC (Navon et al., 2009). In der Studie von Bala et al. konnte demonstriert werden, dass Hsa-mir-9 in der Leberfibrose sowie Hsa-mir-34a und Hsa-mir-148a in metastasierenden HCC's stark herunterreguliert werden (Bala et al., 2009). Ura et al. beschreiben eine differentielle Expression von Hsa-mir-34c zwischen HCC auf Basis einer HBV-Infektion und HCV-basiertem HCC (Ura et al., 2009).

Budhu et al. beschrieben ferner, dass die microRNAs Hsa-mir-1, Hsa-mir-34a, Hsa-mir-148a, Hsa-mir-124 und Hsa-mir-9 im metastatischen HCC herunterreguliert wurden (Budhu et al., 2008).

Wie aus der Studie von Landgraf et al. als auch aus der Datenbank *mirZ* hervorgeht, werden Hsa-mir-9, Hsa-mir-34a und Hsa-mir-148a in gesunder Leber stark exprimiert. Im HCC dagegen erfolgt eine Herunterregulierung dieser Gene (Landgraf et al., 2007). Im Falle von Hsa-mir-9 ließe sich diese Beobachtung anhand epigenetischer Modifikationen begründen, was jedoch bei Hsa-mir-34a und Hsa-mir-148a nicht der Fall ist. Gleichfalls ließe sich auch die Herunterregulierung von Hsa-mir-124 durch die aberrante Methylierung, speziell von Hsa-mir-124-3, erklären. Unsererseits sind jedoch keine Expressionsstudien mit HCC-Zelllinien durchgeführt worden, die mit demethylierenden Agenzien behandelt wurden, um den direkten Einfluss der Methylierung auf die Expression zu messen. Daher sind an dieser Stelle nur spekulative Aussagen möglich. Genaue Schlussfolgerungen über die direkte Korrelation von Methylierung und Expression sind somit nur über eine experimentelle Validierung dieses Zusammenhangs anhand der Untersuchung derselben Fälle möglich.

5.3.1 Expressionsanalyse der microRNA-Kandidaten

5.3.1.1 Expressionsanalyse von Hsa-mir-1 und Hsa-mir-9

Analog zu der Studie von Datta et al. (Datta et al., 2008) wurde von uns überprüft, ob sich ein Zusammenhang zwischen der Methylierung und Expression der microRNA Hsa-mir-1 feststellen lässt, die laut unseren Daten im HCC ein schwacher Kandidat für differentielle Methylierung ist (Kapitel 5.1.6.1).

In den von uns untersuchten Zelllinien ließ sich eine schwach signifikante, inverse Korrelation von Methylierung und Expression feststellen, was die Daten von Datta et al. in diesem Punkt bestätigte (Datta et al., 2008). Als jedoch die Expression in 31 Paaren HCC-Primärtumoren mit angrenzendem nicht-neoplastischen Gewebe untersucht wurde, zeigte sich keine Korrelation von Methylierung und Expression. Obwohl die im Normalgewebe gemessene Expression anhand der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte deutlich höher als in den stärker methylierten Tumoren war, konnte kein Zusammenhang festgestellt werden.

Im Zuge der Expressions- und Methylierungsanalysen wurde auch die Hsa-mir-9-Familie in HCC-Zelllinien und in HCC-Primärtumoren und angrenzendem nicht-neoplastischen Gewebe betrachtet. In den vier HCC-Zelllinien Huh-7, HLE, HLF und HepG2 ließ sich jedoch keine signifikante Korrelation von Methylierung und Expression nachweisen. Daher wurde auch die Situation *in vivo* überprüft. Hierbei stellte sich ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang von Methylierung und Expression heraus.

Hsa-mir-1 kann von zwei genomischen Loci (Hsa-mir-1-1, Hsa-mir-1-2) und Hsa-mir-9 sogar von drei Loci (Hsa-mir-9-1, Hsa-mir-9-2, Hsa-mir-9-3) exprimiert werden, wobei anzumerken ist, dass Hsa-mir-1-2 eine exonische, nicht CpG-Insel assoziierte microRNA ist, an der keine Methylierungsmessung vorgenommen wurde.

Die genomischen Loci waren laut unseren Messungen in allen untersuchten Proben unterschiedlich stark methyliert. Die Expression von den einzelnen Loci konnte nicht erfasst werden, da im Fall der von Applied Biosystems verwendeten qRT-PCR-Technik nur die mature microRNA, die in allen Loci identisch ist, gemessen wird. Deshalb kann die stärkere Methylierung eines Locus nur teilweise die gesamte Expression einer microRNA beeinflussen. Zudem ist Hsa-mir-1-2 nicht mit einer CpG-Insel assoziiert und liegt auf den Exons der nicht-proteinkodierenden Gene BX648566 und AF086463, de-

ren Funktion noch unklar ist. Die Expression der maturen microRNA Hsa-mir-1 hängt demnach von zwei völlig verschiedenen, voneinander unabhängigen Mechanismen ab.

5.3.1.2 microRNA-Expressionsprofile anhand der Datenbank *mirZ*

Anhand der Datenbank *mirZ* zeigte sich nur eine schwache Expression der microRNAs Hsa-mir-9, Hsa-mir-34a und Hsa-mir-148a in gesunder Leber und in den HCC-Zelllinien HepG2 und PLC. In der HCC-Zelllinie Huh-7 ist keine der microRNAs nachgewiesen worden. Die schwache Expression dieser drei microRNAs korrelierte nicht mit der von uns gemessenen Methylierung. Daher ist anzunehmen, dass es sich bei der in HepG2 und PCL gemessenen Expression um Kulturartefakte dieser Zelllinien handelt (Hausser et al., 2009).

5.4 Regulation und Konservierung der microRNA-Kandidaten

5.4.1 Sequenzanalysen basierend auf dem UCSC Genome Browser, WWW Promoter Scan sowie CpG-Island Searcher und CpGplot

Die Untersuchungen der Regulations- und Expressionsmechanismen der microRNA-Kandidaten lieferte zum Einen wichtige Erkenntnisse in Bezug auf die Erstellung von Primerassays für die Methylierungsanalysen und ermöglichte zum Anderen den direkten Vergleich mit den von anderen Arbeitsgruppen untersuchten Regionen. Diese Informationen wurden um die Konservierungsdaten in 17 Mammalia ergänzt und lieferten somit ein umfassendes Bild der genomischen Organisation dieser microRNA-Gene.

Die Entdeckung der Konservierung von microRNAs in Mensch und Nagetieren war ein wichtiger Hinweis für die evolutionäre Bedeutung dieser regulatorischen RNAs (Landgraf et al., 2007). Dieser Hinweis wurde um die Information erweitert, dass orthologe, krebsassoziierte microRNAs im Mensch und Maus entdeckt wurden (Makunin et al., 2007).

Zur Evaluation der Primerassays für die Methylierungsanalysen wurden vor allem die Promotoranalysedaten und CpG-Insel-Vorhersagen verwendet. Die von uns vorhergesagten putativen Promotoren wurden ebenso wie die von Fujita et Iba ermittelten puta-

tiven Promotoren in die Analyse mit einbezogen. Die Distanz der vorhergesagten Promotoren zu der jeweiligen microRNA variierte jedoch stark (Hsa-mir-9-1: Abstand des Promotors zur Precursor-microRNA=60kb; Hsa-mir-9-2: 19bp) und so wurde nur ein Teil der Daten in die von uns untersuchten Regionen integriert. Fujita et Iba räumten außerdem ein, dass Überlappungen mit codierenden Genen auftreten können, die natürlich die Frage mit sich bringen, ob eine Coexpression der microRNA mit ihrem *host gene* möglich ist (Fujita and Iba, 2008).

Neben unseren eigenen Daten aus der Vorhersage von CpG-Inseln wurden auch die Methylierungsdaten von Straussman et al. verwendet, um Rückschlüsse auf die Regulation der microRNA-Kandidaten zu ziehen (Straussman et al., 2009). Neben der Publikation von Straussman et al. existieren noch einige andere Methylierungsdatenbanken, wie z.B. PubMeth (Ongenaert et al., 2008) und MethCancerDB (Lauss et al., 2008), die jedoch keine Methylierungsdaten von microRNA-Genen in der Leber enthalten. Daher wurde die Publikation von Straussman et al. als einzige Referenz dieser Kategorie verwendet.

Die Hsa-mir-9-Familie, deren Mitglieder Hsa-mir-9-1, 9-2 und 9-3 zu den hochkonservierten microRNAs gehören, weist hingegen nur bei Hsa-mir-9-2 in Mammalia hoch konservierte regulatorische Regionen auf. Dies ist jedoch aufgrund der unterschiedlichen chromosomalen Lokalisation in verschiedenen Spezies und der damit verbundenen anders gearteten Regulation nicht weiter verwunderlich; Hsa-mir-9-1 liegt auf Chromosom 1(-), Rno-mir-9-1 auf Chromosom 2(+) und Mmu-mir-9-1 auf Chromosom 3(+) (<http://www.mirbase.org/>). Die CpG-Inseln von Hsa-mir-9-1 und 9-3 sind in gesunder Leber laut Straussman et al. nicht methyliert, was auf eine aberrante Methylierung im HCC schließen lässt. Die CpG-Inseln von Hsa-mir-9-2 tauchen allerdings bei Straussman et al. nicht auf, da diese nur mit einer minimalen Stringenz der Vorhersagekriterien detektierbar sind. Dennoch konnte von uns bei dieser microRNA eine signifikante, differentielle Hypermethylierung im FLC festgestellt werden.

Die microRNA Hsa-mir-663, die ebenfalls als starker Kandidat von uns ermittelt wurde, gehört zu den schwach konservierten microRNAs. Sie weist ebenso schwach konservierte cis-regulatorische Elemente auf. Die mit zwei putativen Promotoren assoziierte CpG-Insel war in zwei von drei Fällen gesunder Leber (Straussman et al., 2009) nur schwach methyliert, was bei der von uns ermittelten, signifikant differentiellen Methylierung im HCC und FLC ebenso wie bei Hsa-mir-9 auf eine aberrante Methylierung im Leberkrebs schließen lässt.

Obwohl die cis-regulatorischen Regionen der microRNA-Kandidaten im Gegensatz zu den microRNAs selbst nicht hochkonserviert sind, kann dennoch von einer wichtigen

phylogenetischen Funktion dieser microRNAs ausgegangen werden, da deren Sequenzen und damit auch deren Zielgene im Verlauf der Evolution der Säugetiere erhalten geblieben sind.

Anhand der Methylierungsdaten von Straussman et al. konnte demonstriert werden, dass die meisten microRNA-Kandidaten in der gesunden Leber unmethyliert sind. Daher kann bei diesen microRNAs angenommen werden, dass eine krebsspezifische, aberrante Methylierung vorhanden ist. Ausnahmen bilden hierbei die microRNAs Hsa-mir-34a, die in zwei von drei Fällen schwach methyliert ist und eine ebenfalls schwache Methylierung im Leberkrebs aufweist, sowie die microRNA Hsa-mir-596, die in $\frac{2}{3}$ der Fälle in gesunder Leber stark methyliert und auch gelegentlich im HCC signifikant hypermethyliert ist (Straussman et al., 2009).

5.5 Biologische Funktion der microRNAs

5.5.1 Funktion und validierte Zielgene der microRNA-Kandidaten

Im Folgenden werden die Funktionen der microRNA-Kandidaten und ihrer validierten Zielgene anhand von Informationen diskutiert, die größtenteils der Datenbank Melanoma Molecular Map Project (<http://www.mmmp.org/MMMP/>) entnommen wurden, wobei speziell auf die Expression und Regulation in der Leber beziehungsweise im HCC eingegangen wird.

1. Hsa-mir-1

Die microRNA Hsa-mir-1-1 ist in der Muskelentwicklung und -funktion involviert und bildet zusammen mit Hsa-mir-1-2 (Chr. 18) die Hsa-mir-1 microRNA-Familie (<http://www.mirbase.org/>). Sie wird vor allem in Muskeln exprimiert und ihre Expression wird von dem Transkriptionsfaktor MEF2 gefördert (Liu et al., 2007).

Die Funktion von Hsa-mir-1 in der Hepatokarzinogenese ist jedoch fraglich, da die hierzu von Datta et al. publizierten Daten bezüglich der Regulation und Expression anzuzweifeln sind (Kapitel 5.1.3).

2. Hsa-mir-9

Hsa-mir-9-1 bildet zusammen mit den microRNAs Hsa-mir-9-2 und Hsa-mir-9-3 die Hsa-mir-9-Familie (<http://www.mirbase.org/>).

Die microRNA Hsa-mir-9 ist im Medulloblastom herunterreguliert und bei Wiederherstellung der Expression verursacht sie einen Stopp des Zellwachstums und löst Apoptose aus, indem sie das proliferative Gen TRKC reguliert (Ferretti et al., 2009). Eine aberrante DNA-Methylierung der Gene der Hsa-mir-9-Familie in der Leber ist bisher nicht publiziert.

Es wurden jedoch Leber- und HCC-spezifische Expressionsmuster dieser microRNA entdeckt. Laut Bala et al. wird Hsa-mir-9 in der Leberfibrose herunterreguliert (Bala et al., 2009). Die Hochregulierung von Hsa-mir-9 im HCC sollte als Indikator für intrahepatische Metastasierung dienen. Des Weiteren wurde E-cadherin als experimentell bestätigtes, putatives Target von Hsa-mir-9 identifiziert (Hao-Xiang et al., 2009). Im Gegensatz dazu beschrieben Budhu et al., dass Hsa-mir-9 im metastatischen HCC herunterreguliert wurde (Budhu et al., 2008).

3. Hsa-mir-34

Hsa-mir-34a bildet zusammen mit den microRNAs Hsa-mir-34b und Hsa-mir-34c die Hsa-mir-34 Familie (<http://www.mirbase.org/>).

Die Expression von Hsa-mir-34 wird durch DNA-Schäden und onkogenen Stress induziert. Dies geschieht in Abhängigkeit zu *p53*, da Hsa-mir-34 ein Zielgen von *p53* ist. Die Überexpression von Hsa-mir-34a führt zu Apoptose oder zellulärer Seneszenz, wohingegen die Verminderung der Expression der microRNA den *p53*-vermittelten Zelltod abschwächt (He et al., 2007b) und (He et al., 2007a).

Hsa-mir-34a wirkt, gemeinsam mit *p21* und *14-3-3 σ* , die allesamt *p53* Zielgene sind, hemmend auf die *p53*-induzierte Apoptose in Tumorzellen ein. Die Inaktivierung dieser drei Gene könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Antworten (Zellzyklusarrest oder Apoptose) auf den *p53*-Aktivator *Nutlin-3* sein (Paris et al., 2008).

Hsa-mir-34b und Hsa-mir-34c, zwei Komponenten des *p53* Netzwerkes, werden epigenetisch im Kolorektalkarzinom aber nicht in gesunder Kolonschleimhaut inaktiviert; diese Herunterregulierung kann durch demethylierende Agenzien wie 5-Aza-2'-Deoxycytidin rückgängig gemacht werden. Beide microRNAs werden durch dieselbe CpG-Insel reguliert. Die epigenetische Inaktivierung dieser CpG-Insel beeinflusst auch

die Repression von *BTG4* (*B-cell translocation gene 4*), einem putativen Tumorsuppressorgen (Toyota et al., 2008).

Hsa-mir-34 wird in vielen Tumoren durch Promotorhypermethylierung inaktiviert (Lodygin et al., 2008). *c-MET* wurde sowohl im hepatozellulären Karzinom als auch im Uvealmelanom als Zielgen von Hsa-mir-34a identifiziert (Li et al., 2009b) und (Yan et al., 2009), es ist außerdem ein Zielgen von Hsa-mir-34b (Migliore et al., 2008).

Die induzierte Expression von Hsa-mir-34b und Hsa-mir-34c in Krebszellen, in denen diese microRNAs epigenetisch inaktiviert wurden, inhibiert ihre Beweglichkeit, reduziert das Tumorstadium und hemmt die Metastasenbildung in Xenograft-Modellen. Dies ist mit einer Herunterregulierung der onkogenen Zielgene *c-MYC*, *E2F3*, *CDK6* und *TGIF2* dieser beiden microRNAs verbunden (Lujambio et al., 2008).

4. Hsa-mir-124 (vormalige Bezeichnung: Hsa-mir-124a)

Die Hsa-mir-124-Familie besteht aus den drei Mitgliedern Hsa-mir-124-1, Hsa-mir-124-2 und Hsa-mir-124-3 (<http://www.mirbase.org/>).

Hsa-mir-124 wird vornehmlich in Neuronen (Makeyev et al., 2007) und im Gehirn exprimiert (Smirnova et al., 2005).

Die Überexpression von Hsa-mir-124 führt zu der Herunterregulierung vieler Zellzyklus-assoziierten Gene wie *CD164* (einem Suppressor der hämatopoetischen Zellproliferation), *GAS2L1* (einem Aktin-assoziierten Protein, dass in großer Menge in wachstumsgehemmten Zellen vorkommt) und *SLC16A1*, das eine Arretierung des Zellzyklus sowie Differenzierung induziert und dessen Expression in der Kolonkarzinogenese signifikant herunterreguliert wird (Wang, 2006).

Hsa-mir-124-1 inhibiert außerdem die Expression von *CEBPA* (CCAAT/enhancer binding protein alpha), einem der wichtigsten regulatorischen Transkriptionsfaktoren des hämatopoetischen Systems. Der Verlust von *CEBPA* kann zu einer Blockierung der Differenzierung in der Granulopoese und somit zur leukämischen Transformation führen (Hackanson et al., 2008). Im Medulloblastom wird Hsa-mir-124 herunterreguliert und inhibiert die Expression von *CDK6* (Pierson et al., 2008).

Die microRNA ist in die Entwicklung des Zentralnervensystems involviert, indem sie die Zielgene *SCP1* (*small C-terminal domain phosphatase 1*) und *PTBP1* reguliert (ein RNA-bindendes Protein, das das alternative Spleißen von Pre-mRNA reprimiert) (Visvanathan et al., 2007) und (Makeyev et al., 2007).

Die erzwungene Expression von Hsa-mir-124 hemmt die Zellproliferation und induziert die Differenzierung von Gehirntumoren (Silber et al., 2008) und (Pierson et al., 2008).

5. Hsa-mir-148a

Zusammen mit den microRNAs Hsa-mir-148b und mir-152 bilden sie die microRNA-148 Familie (<http://microrna.sanger.ac.uk>).

Hsa-mir-148 reprimiert die Expression der DNA-Methyltransferase 3b (DNMT3b) (Duursma et al., 2008). Die induzierte Expression von Hsa-mir-148a in Krebszellen, in denen diese microRNA epigenetisch inaktiviert wurde, inhibiert ihre Beweglichkeit, reduziert das Tumorwachstum und hemmt die Metastasenbildung in Xenograft-Modellen. Dies ist mit einer Herunterregulierung der onkogenen Zielgene der microRNA, *c-MYC*, *E2F3*, *CDK6* und *TGIF2* verbunden (Lujambio et al., 2008).

6. Hsa-mir-596

Die microRNA Hsa-mir-596 ist das einzige bisher bekannte Mitglied ihrer Familie. Es sind bis zum heutigen Zeitpunkt keine validierten Zielgene und keine Regulationsmechanismen bekannt.

7. Hsa-mir-663

Zusammen mit der microRNA Hsa-mir-663b bilden sie die Hsa-mir-663 Familie (<http://www.mirbase.org/>). Bis dato sind keine validierten Zielgene von Hsa-mir-663 bekannt.

Im Mammakarzinom wurde eine aberrante Methylierung von Hsa-mir-663 zusammen mit Hsa-mir-124a3, Hsa-mir-148, Hsa-mir-152 und Hsa-mir-9-1 beobachtet. Diese korreliert mit der Methylierung putativer Tumorsuppressorgene, wie zum Beispiel *SOCS-1* (Lehmann et al., 2008).

Zusammenfassend sind nur die microRNA-Kandidaten Hsa-mir-1 und die microRNA-Familien Hsa-mir-34 und Hsa-mir-124 in der Hepatokarzinogenese mit einer putativen Tumorsuppressorfunktion beschrieben worden. Somit verbleiben die Hsa-mir-9-Familie, Hsa-mir-148a, Hsa-mir-596 und Hsa-mir-663, über die keine funktionalen Aussagen im HCC getroffen werden können.

Viele Studien begründen die Regulation eines Zielgens durch eine microRNA nur anhand von Expressionsdaten auf RNA-Ebene. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die inverse Korrelation der Expression einer microRNA zu der Expression einer putativen Ziel-mRNA ein äußerst seltenes Ereignis darstellt (Guimbellot et al., 2009). Um eine zuverlässige Validierung durchzuführen, sollte daher erstens die Regulation der microRNA auf Proteinebene überprüft werden, da unvollständiges *seed pairing* zu einer Inhibition der Translation, nicht aber zu einem Abbau der Ziel-mRNA führt. Zweitens sollten Bindestudien durchgeführt werden, in denen die Bindung der microRNA an die 3'-UTR einer mRNA nachgewiesen wird. Drittens sollten Reporteranalysen folgen, in denen die 3'-UTR in einen Reportervektor kloniert und die Expression des Reportergens gezielt durch die microRNA inhibiert werden.

Erst nach Durchführung dieser Schritte sollte bei enger Auslegung der Terminus *experimentell validiert* verwendet werden, um falsch positive Interaktionen auszuschließen.

5.6 Bioinformatische Vorhersage von microRNA-Zielgenen

5.6.1 Evaluation von microRNA-Zielgen-Vorhersage-Algorithmen

Unsere Analyse zeigte die Bedeutung der zeitgleichen Nutzung mehrerer Algorithmen, um die Vorhersageergebnisse der sieben verwendeten Programme zu kondensieren und zu spezifizieren. Neben dem Vorteil, stringenter Resultate zu erhalten, können so auch die wahrscheinlichsten putativen Zielgene in eine nachfolgende Untersuchung mit einbezogen werden. Gleichzeitig stellte sich jedoch auch die Ambivalenz einer solchen Analyse heraus, sofern diese nicht mit experimentellen Daten validiert, oder vom Experimentator selbst in eine *a priori* definierte Richtung gelenkt wird. Die reine *in silico* Analyse von microRNA-Zielgenen steckt somit immer noch in den Anfängen und muss akribisch mit bestehenden Daten abgeglichen, oder mit experimentellen Analysen untermauert werden. Dennoch wurden drei Programme als jeweils Beste der Kategorien Spezifität (DIANA TarBase), Sensitivität (miRanda) und der Kombination beider Kategorien (TargetscanS) ermittelt. DIANA Tarbase ist allerdings eine Datenbank experimentell validierter microRNA-Zielgene. Die beiden Algorithmen miRanda und TargetscanS wurden unabhängig von dieser Untersuchung auch von anderen Gruppen als

zur Zeit beste microRNA-Zielgenvorhersageprogramme ermittelt (Pineau et al., 2009) und (Doran and Strauss, 2007).

5.6.2 Eine neue Methode der microRNA-Zielgenvorhersage

Die Auswahl der von uns verwendeten Zielgenvorhersage-Algorithmen begründete sich neben unseren Testergebnissen auch auf den in der Literaturrecherche gesammelten Informationen. Sowohl die Gruppe um Pineau et al. als auch die Arbeitsgruppe von Gramantieri et al. haben Targetscan, Pictar und miRanda zur Zielgenvorhersage verwendet (Pineau et al., 2009) und (Gramantieri et al., 2009).

Da Targetscan.org und TargetscanS häufig in einem Kontext betrachtet werden, offerierte sich die Frage, welcher der beiden Algorithmen sich in der Praxis am besten bewährt. Chaudhuri und Chatterjee zeigten, dass TargetscanS sich als der effizientere der beiden Algorithmen erwiesen hatte (Chaudhuri and Chatterjee, 2007). Zur gleichen Zeit demonstrierten Doran und Strauss, dass PicTar und TargetscanS die seinerzeit besten Algorithmen darstellten (Doran and Strauss, 2007).

Die von uns etablierte Methode zeigte sich nach der Analyse der vier microRNAs mit den meisten validierten Zielgenen als die in $\frac{3}{4}$ der Fälle beste Methode mit der höchsten Trefferquote an validierten Zielgenen im Gesamtoutput. Diese Resultate waren zwar nicht statistisch signifikant, dafür aber deutlich zu erkennen. Nur im Fall der microRNA Hsa-mir-125b, von der nur 43 validierte Zielgene bekannt waren, erwies sich miRecords als das beste Programm, was ebenfalls nicht signifikant war. Hierzu muss jedoch erwähnt werden, dass bei der 7,7-fachen Menge an putativen Zielgenen (miRecords: 2222 putative Zielgene = 11% des menschlichen Genoms mit etwa 25.000 Genen) die Chance ungleich höher ist, dass insgesamt 43 Gene erkannt werden, als bei den von uns ermittelten 289 putativen Zielgenen.

Bei der Anzahl der putativen Zielgene, die möglichst gering ausfallen sollte, zeigte sich die von uns entwickelte Methode in allen vier Fällen als die Beste, da sie bei allen untersuchten microRNAs am wenigsten putative Zielgene lieferte. Dies ist insofern ebenfalls positiv zu werten, als dass trotz fehlender Signifikanz eine starke Eingrenzung der weiter zu untersuchenden Zielgene erfolgte (Abbildung 53 bis Abbildung 56).

Aufgrund der begrenzten Anzahl an zur Verfügung stehenden microRNAs mit einer größeren Anzahl validierter Zielgene von mindestens 75-100 Genen in der als Quelle

verwendeten Datenbank konnte unsere Methode nicht an weiteren microRNAs exemplarisch getestet werden.

Dennoch ist unsere Vorgehensweise eine leicht durchzuführende Methode, anhand bestehender Algorithmen eine optimierte Zielgenvorhersage sowohl mit einer geringeren Anzahl an vorhergesagten Zielgenen als auch einer hohen Wahrscheinlichkeit auf die positive Vorhersage von tatsächlichen Zielgenen durchzuführen.

Insgesamt hat sich diese Methode als eine den zur Zeit verfügbaren, übergreifenden Analyseprogrammen leicht überlegene Alternative erwiesen, die auch von anderen Forschungsgruppen ohne Schwierigkeiten eingesetzt werden kann.

5.7 Genontologie-Kategorisierung der microRNA-Zielgene

5.7.1 Krebspezifische putative Zielgene der microRNA-Kandidaten

Analog zu der Studie von Wang et al. sollte eine GO-Analyse mit DAVID durchgeführt werden (Wang et al., 2008).

Es wurden zwar bei allen microRNAs bis auf bei Hsa-mir-596 und Hsa-mir-663 angereicherte Zielgene entdeckt, die entweder mit Stoffwechselwegen in der Karzinogenese oder bestimmten Krebserkrankungen assoziiert waren, jedoch stand keine dieser Zielengruppen mit der Hepatokarzinogenese oder leberspezifischen Stoffwechselwegen in Zusammenhang.

Die Funktion der in der Studie von Wang et al. untersuchten Zielgene von Hsa-mir-224 wurde gleichzeitig experimentell validiert, was die Aussage über die in der GO-Analyse ermittelten allgemeinen Funktionen, wie Apoptosepotential oder bestimmte Stoffwechselwege im Krebs, erleichtert.

Demzufolge ist es zum heutigen Zeitpunkt mit den vorhandenen Mitteln noch nicht möglich, die putativen Zielgene der microRNA-Kandidaten durch die reine *in silico* Kategorisierung in Genontologie-Cluster zweckmäßig für weiterführende Analysen in der Leber aufzuarbeiten.

Anhang A: Sequenzanalysen der microRNA-Kandidaten

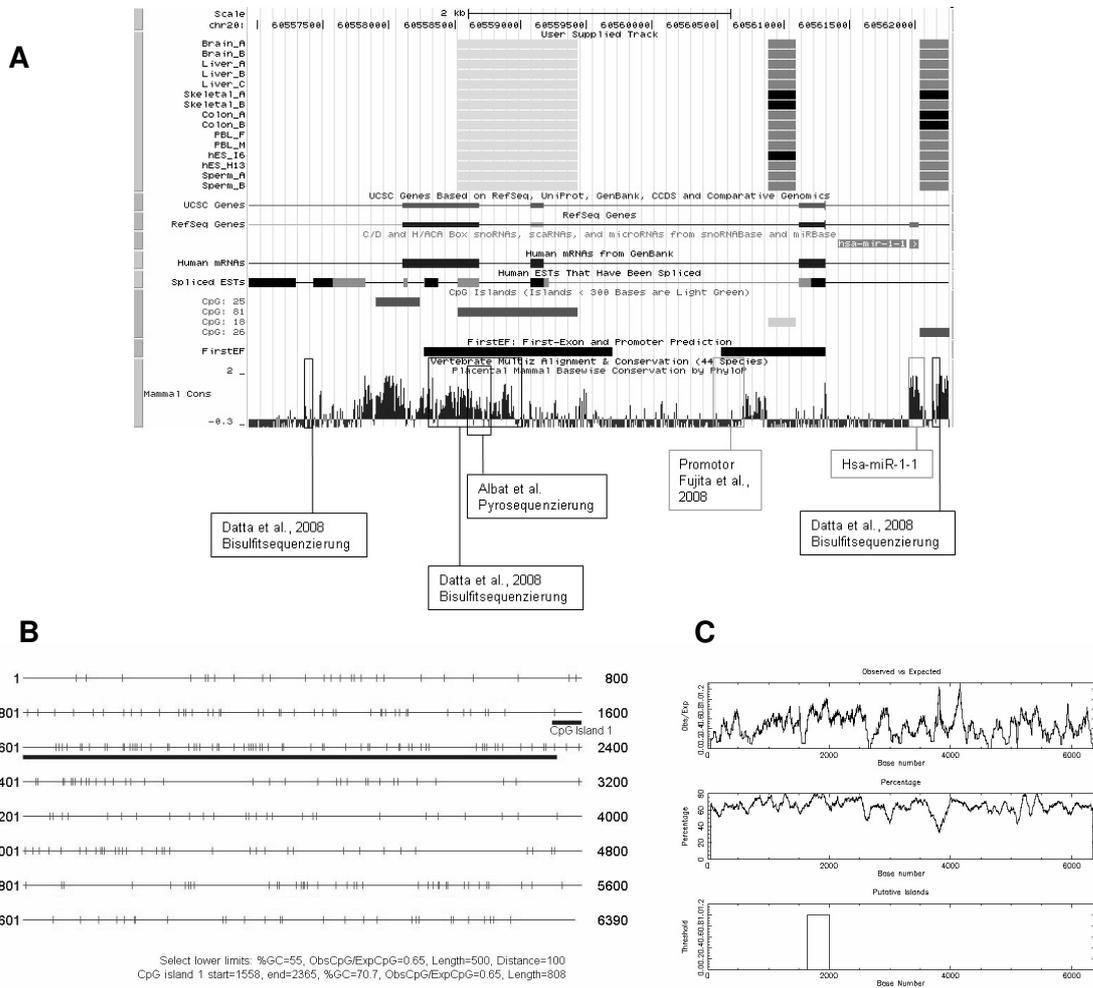


Abbildung 60 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-miR-1-1. (A) Darstellung des Methylierungsgrades der untersuchten CpG-Insel: grün= unmethyliert, schwarz= unbestimmt, rot=methyliert (Straussman et al., 2009); Lage von Genen und mRNAs (breite Balken= Exons, dünne Linien= Introns); putative CpG-Inseln (grüne Balken; hellgrüne Balken= <300bp Länge); Regulationsmechanismen aus FirstEF (schwarze Balken= putative Promotoren, CpG-Inseln und erste Exons); Konservierung in 17 Mammalia (blaue Histogrammfläche); (B), (C) 6500bp Kontext; (B) putative CpG-Insel nach Vorhersage mit *CpG-Island Searcher* (blaue Balken= CpG-Inseln; rote Striche= CpG-Dinukleotide; schwarze Linie= DNA-Sequenz (bp)); (C) putative CpG-Insel nach Vorhersage mit *CpGplot* (von oben nach unten: Kurven für das Verhältnis von beobachteten zu erwarteten CpG-Dinukleotiden, GC-Gehalt; CpG-Inseln (schwarz umrandete Box)).

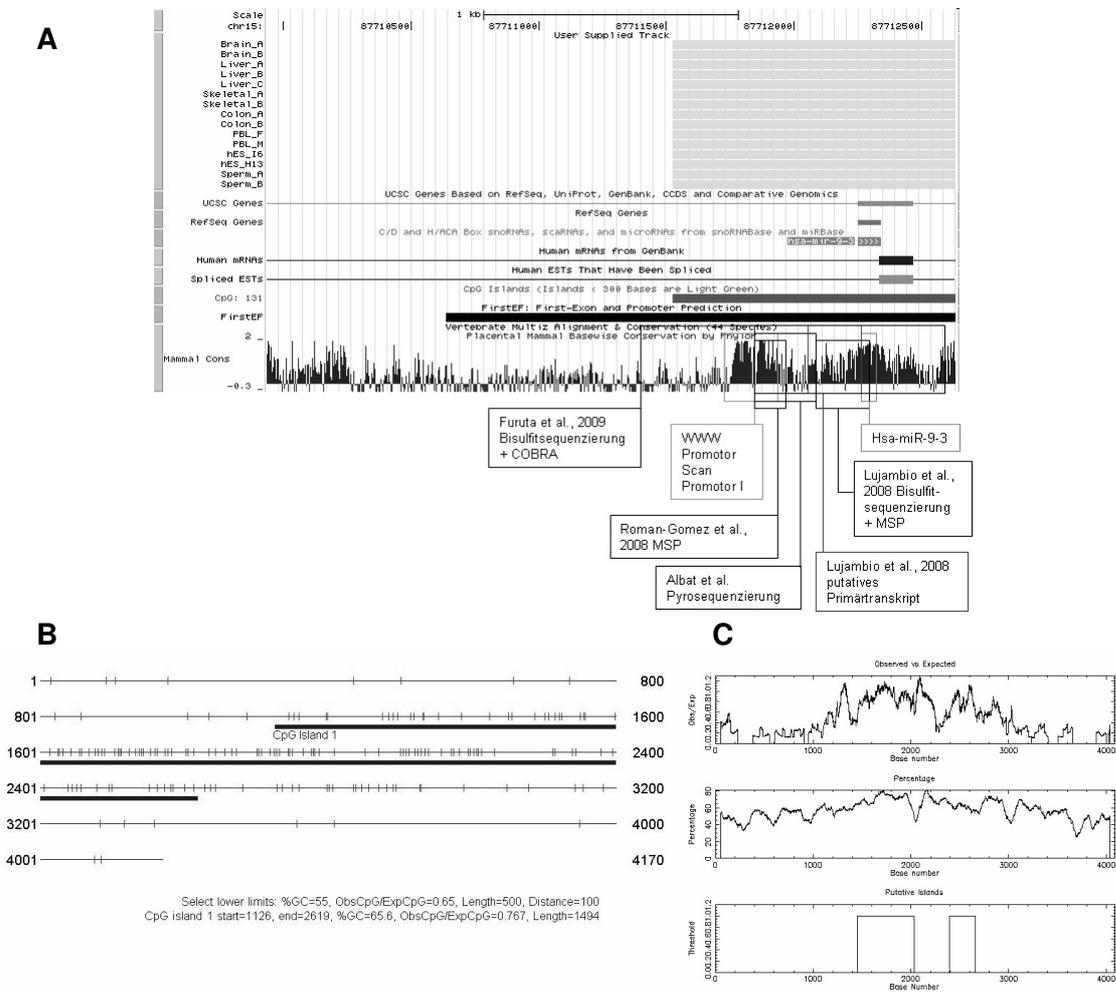


Abbildung 62 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-mir-9-3. (A) Darstellung des Methylierungsgrades der untersuchten CpG-Insel: grün= unmethyliert, schwarz= unbestimmt, rot= methyliert (Straussman et al., 2009); Lage von Genen und mRNAs (breite Balken= Exons, dünne Linien= Introns); putative CpG-Inseln (grüne Balken; hellgrüne Balken= <300bp Länge); Regulationsmechanismen aus FirstEF (schwarze Balken= putative Promotoren, CpG-Inseln und erste Exons); Konservierung in 17 Mammalia (blaue Histogrammfläche); (B) putative CpG-Insel nach Vorhersage mit *CpG-Island Searcher* (blaue Balken= CpG-Inseln; rote Striche= CpG-Dinukleotide; schwarze Linie= DNA-Sequenz (bp)); (C) putative CpG-Insel nach Vorhersage mit *CpGplot* (von oben nach unten: Kurven für das Verhältnis von beobachteten zu erwarteten CpG-Dinukleotiden, GC-Gehalt; CpG-Inseln (schwarz umrandete Box)).

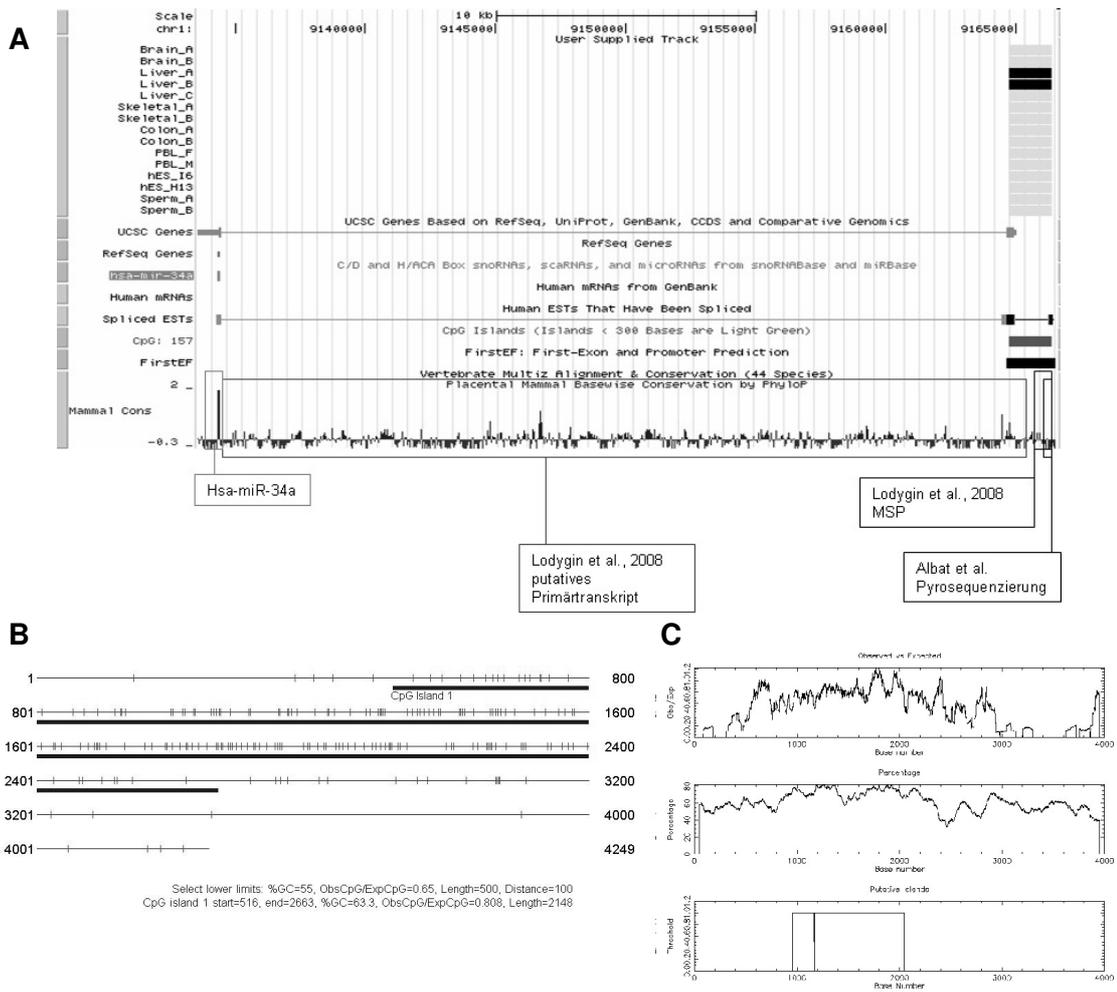


Abbildung 63 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-miR-34a. (A) Darstellung des Methylierungsgrades der untersuchten CpG-Insel: grün= unmethyliert, schwarz= unbestimmt, rot= methyliert (Straussman et al., 2009); Lage von Genen und mRNAs (breite Balken= Exons, dünne Linien= Introns); putative CpG-Inseln (grüne Balken; hellgrüne Balken= <300bp Länge); Regulationsmechanismen aus FirstEF (schwarze Balken= putative Promotoren, CpG-Inseln und erste Exons); Konservierung in 17 Mammalia (blaue Histogrammfläche); (B), (C) 4000bp Kontext der -30kb Promotorregion; (B) putative CpG-Insel nach Vorhersage mit *CpG-Island Searcher* (blaue Balken= CpG-Inseln; rote Striche= CpG-Dinukleotide; schwarze Linie= DNA-Sequenz (bp)); (C) putative CpG-Insel nach Vorhersage mit *CpGplot* (von oben nach unten: Kurven für das Verhältnis von beobachteten zu erwarteten CpG-Dinukleotiden, GC-Gehalt; CpG-Inseln (schwarz umrandete Box)).

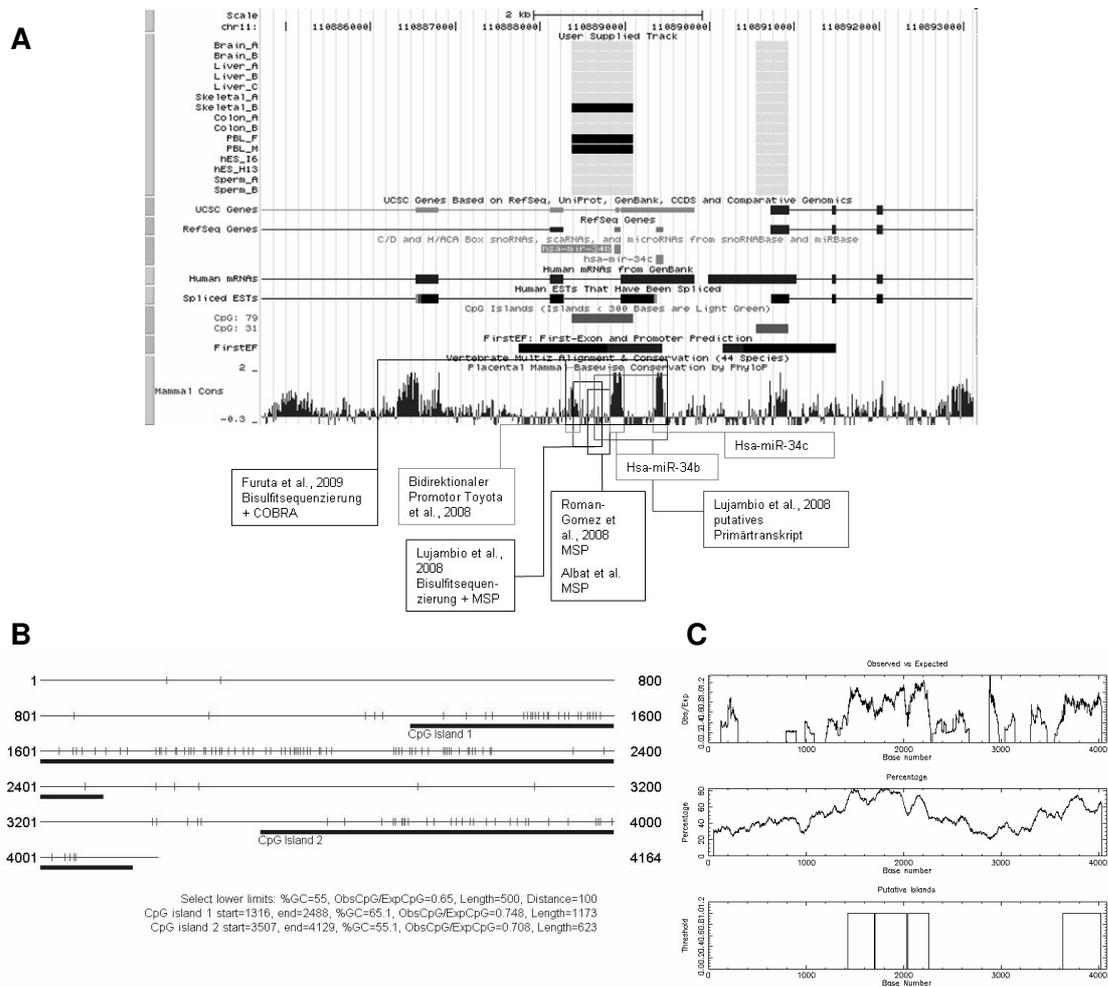


Abbildung 64 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-mir-34b/c. (A) Darstellung des Methylierungsgrades der untersuchten CpG-Insel: grün= unmethyliert, schwarz= unbestimmt, rot= methyliert (Straussman et al., 2009); Lage von Genen und mRNAs (breite Balken= Exons, dünne Linien= Introns); putative CpG-Inseln (grüne Balken; hellgrüne Balken= <300bp Länge); Regulationsmechanismen aus FirstEF (schwarze Balken= putative Promotoren, CpG-Inseln und erste Exons); Konservierung in 17 Mammalia (blaue Histogrammfläche); (B) putative CpG-Insel nach Vorhersage mit *CpG-Island Searcher* (blaue Balken= CpG-Inseln; rote Striche= CpG-Dinukleotide; schwarze Linie= DNA-Sequenz (bp)); (C) putative CpG-Insel nach Vorhersage mit *CpGplot* (von oben nach unten: Kurven für das Verhältnis von beobachteten zu erwarteten CpG-Dinukleotiden, GC-Gehalt; CpG-Inseln (schwarz umrandete Box)).

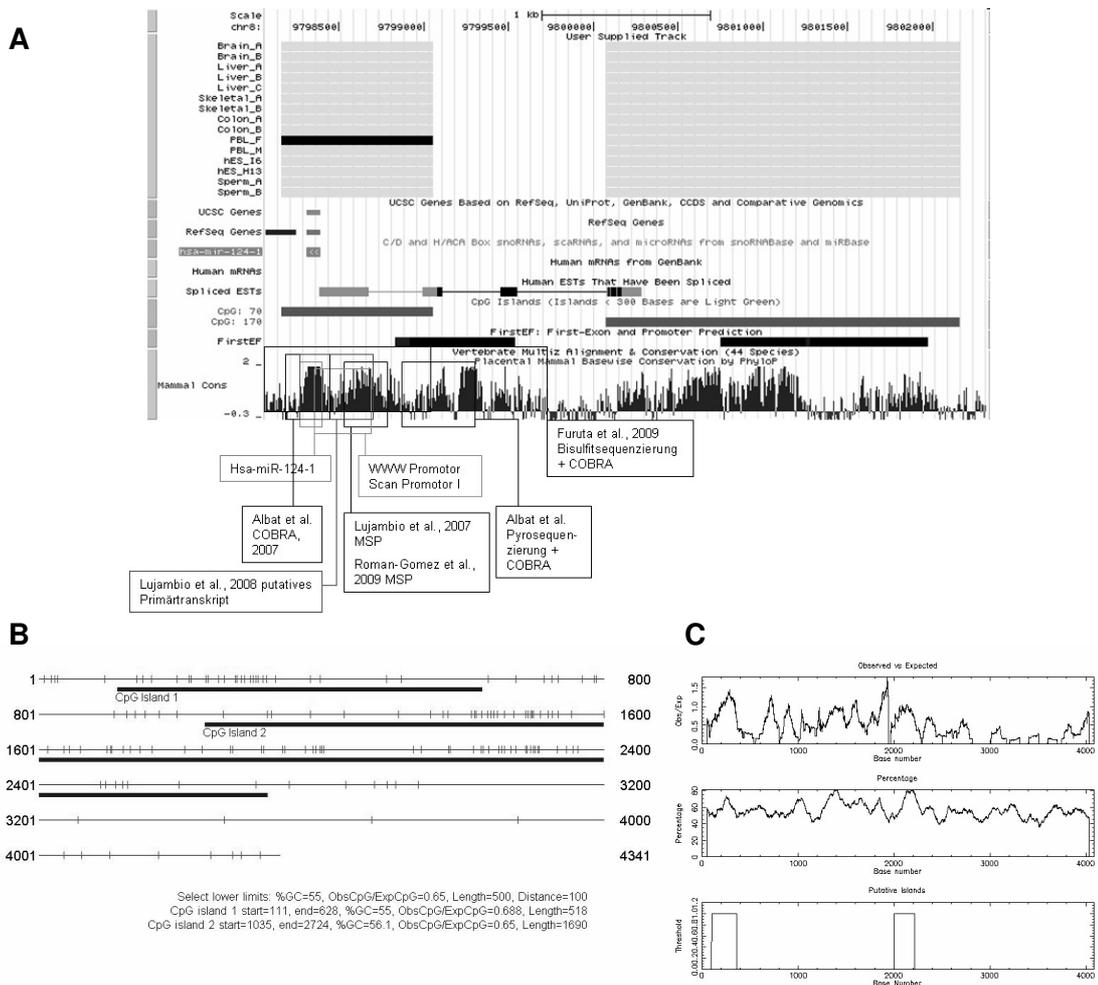


Abbildung 65 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-mir-124-1. (A) Darstellung des Methylierungsgrades der untersuchten CpG-Insel: grün= unmethyliert, schwarz= unbestimmt, rot= methyliert (Straussman et al., 2009); Lage von Genen und mRNAs (breite Balken= Exons, dünne Linien= Introns); putative CpG-Inseln (grüne Balken; hellgrüne Balken= <300bp Länge); Regulationsmechanismen aus FirstEF (schwarze Balken= putative Promotoren, CpG-Inseln und erste Exons); Konservierung in 17 Mammalia (blaue Histogrammfläche); (B) putative CpG-Insel nach Vorhersage mit *CpG-Island Searcher* (blaue Balken= CpG-Inseln; rote Striche= CpG-Dinukleotide; schwarze Linie= DNA-Sequenz (bp)); (C) putative CpG-Insel nach Vorhersage mit *CpGplot* (von oben nach unten: Kurven für das Verhältnis von beobachteten zu erwarteten CpG-Dinukleotiden, GC-Gehalt; CpG-Inseln (schwarz umrandete Box)).

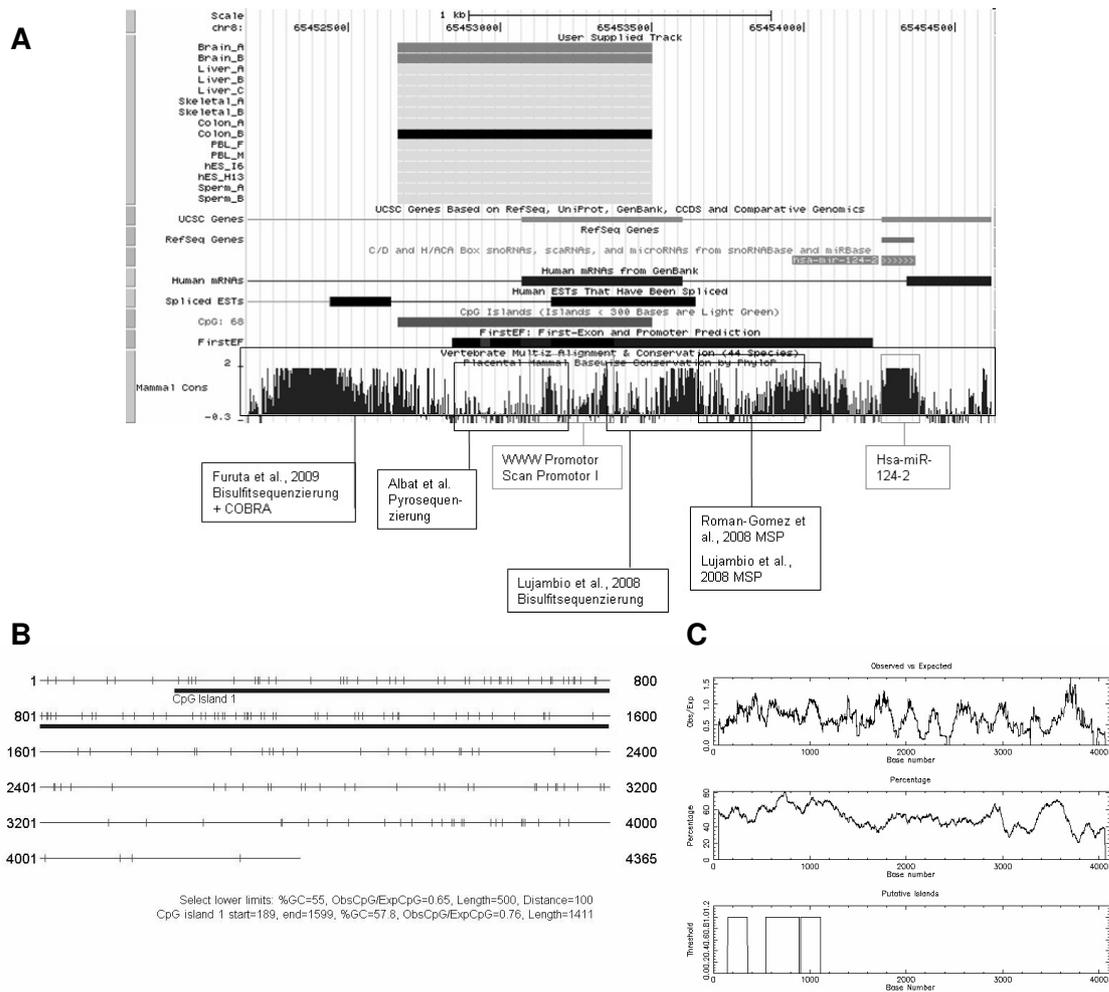


Abbildung 66 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-miR-124-2. (A) Darstellung des Methylierungsgrades der untersuchten CpG-Insel: grün= unmethyliert, schwarz= unbestimmt, rot= methyliert (Straussman et al., 2009); Lage von Genen und mRNAs (breite Balken= Exons, dünne Linien= Introns); putative CpG-Inseln (grüne Balken; hellgrüne Balken= <300bp Länge); Regulationsmechanismen aus FirstEF (schwarze Balken= putative Promotoren, CpG-Inseln und erste Exons); Konservierung in 17 Mammalia (blaue Histogrammfläche); (B) putative CpG-Insel nach Vorhersage mit *CpG-Island Searcher* (blaue Balken= CpG-Inseln; rote Striche= CpG-Dinukleotide; schwarze Linie= DNA-Sequenz (bp)); (C) putative CpG-Insel nach Vorhersage mit *CpGplot* (von oben nach unten: Kurven für das Verhältnis von beobachteten zu erwarteten CpG-Dinukleotiden, GC-Gehalt; CpG-Inseln (schwarz umrandete Box)).

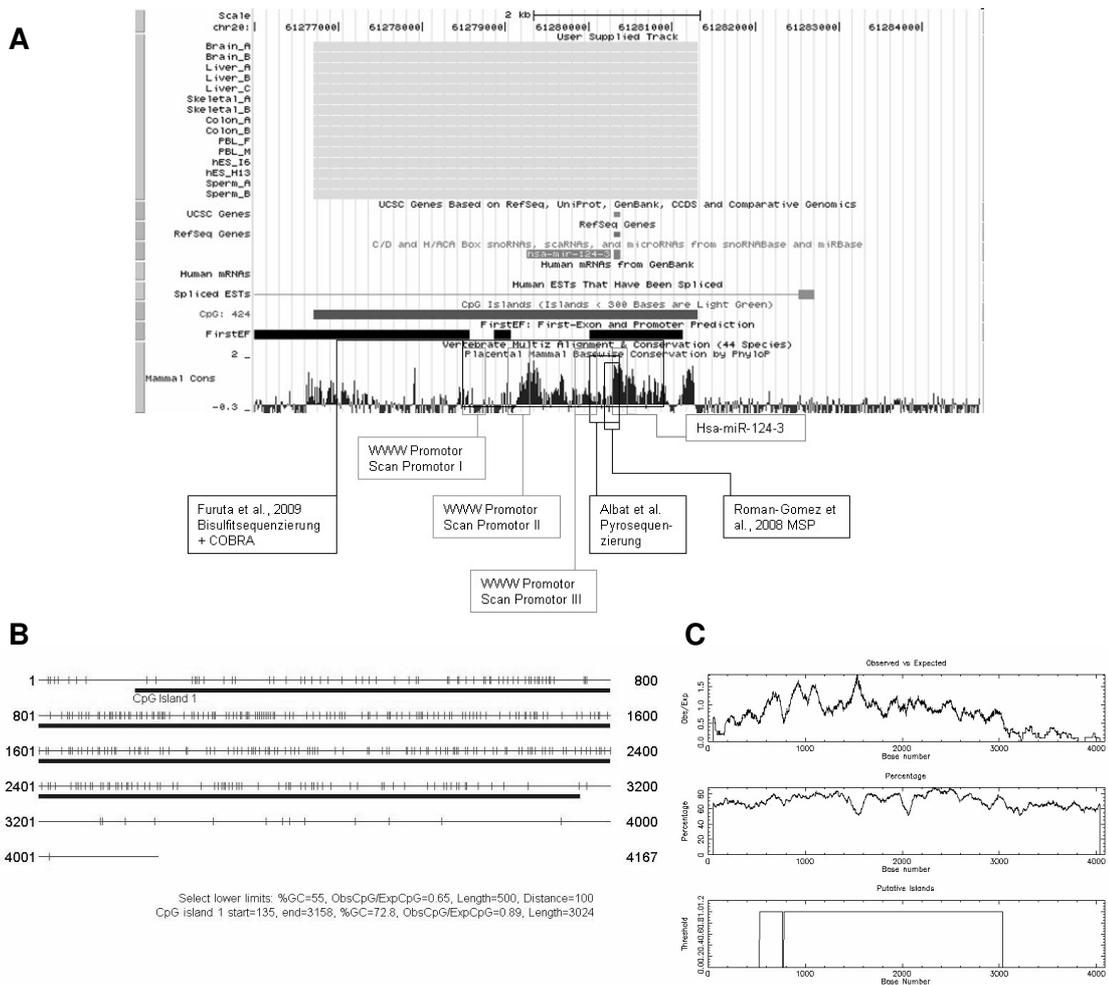


Abbildung 67 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-mir-124-3. (A) Darstellung des Methylierungsgrades der untersuchten CpG-Insel: grün= unmethyliert, schwarz= unbestimmt, rot= methyliert (Straussman et al., 2009); Lage von Genen und mRNAs (breite Balken= Exons, dünne Linien= Introns); putative CpG-Inseln (grüne Balken; hellgrüne Balken= <300bp Länge); Regulationsmechanismen aus FirstEF (schwarze Balken= putative Promotoren, CpG-Inseln und erste Exons); Konservierung in 17 Mammalia (blaue Histogrammfläche); (B) putative CpG-Insel nach Vorhersage mit *CpG-Island Searcher* (blaue Balken= CpG-Inseln; rote Striche= CpG-Dinucleotide; schwarze Linie= DNA-Sequenz (bp)); (C) putative CpG-Insel nach Vorhersage mit *CpGplot* (von oben nach unten: Kurven für das Verhältnis von beobachteten zu erwarteten CpG-Dinucleotiden, GC-Gehalt; CpG-Inseln (schwarz umrandete Box)).

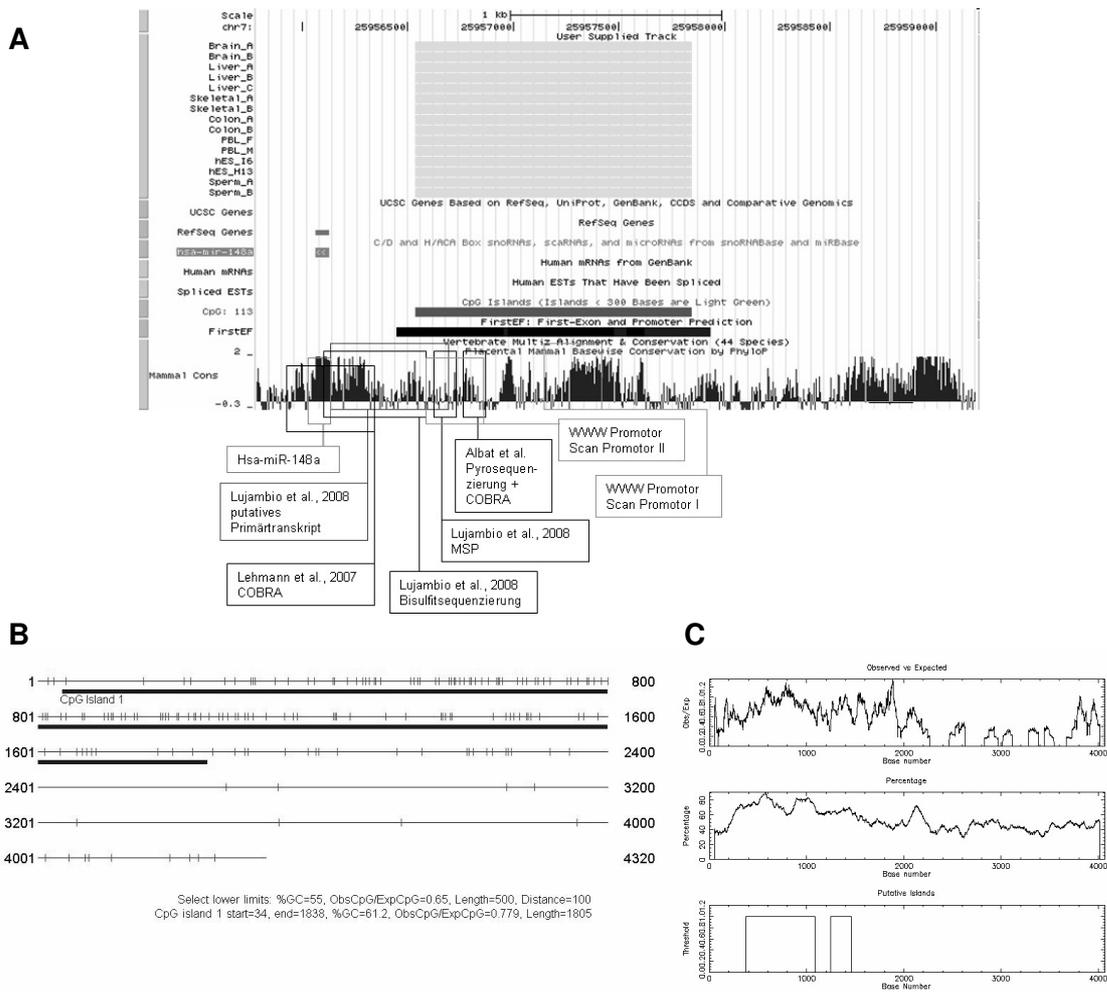


Abbildung 68 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-mir-148a. (A) Darstellung des Methylierungsgrades der untersuchten CpG-Insel: grün= unmethyliert, schwarz= unbestimmt, rot= methyliert (Straussman et al., 2009); Lage von Genen und mRNAs (breite Balken= Exons, dünne Linien= Introns); putative CpG-Inseln (grüne Balken; hellgrüne Balken= <300bp Länge); Regulationsmechanismen aus FirstEF (schwarze Balken= putative Promotoren, CpG-Inseln und erste Exons); Konservierung in 17 Mammalia (blaue Histogrammfläche); (B) putative CpG-Insel nach Vorhersage mit *CpG-Island Searcher* (blaue Balken= CpG-Inseln; rote Striche= CpG-Dinukleotide; schwarze Linie= DNA-Sequenz (bp)); (C) putative CpG-Insel nach Vorhersage mit *CpGplot* (von oben nach unten: Kurven für das Verhältnis von beobachteten zu erwarteten CpG-Dinukleotiden, GC-Gehalt; CpG-Inseln (schwarz umrandete Box)).

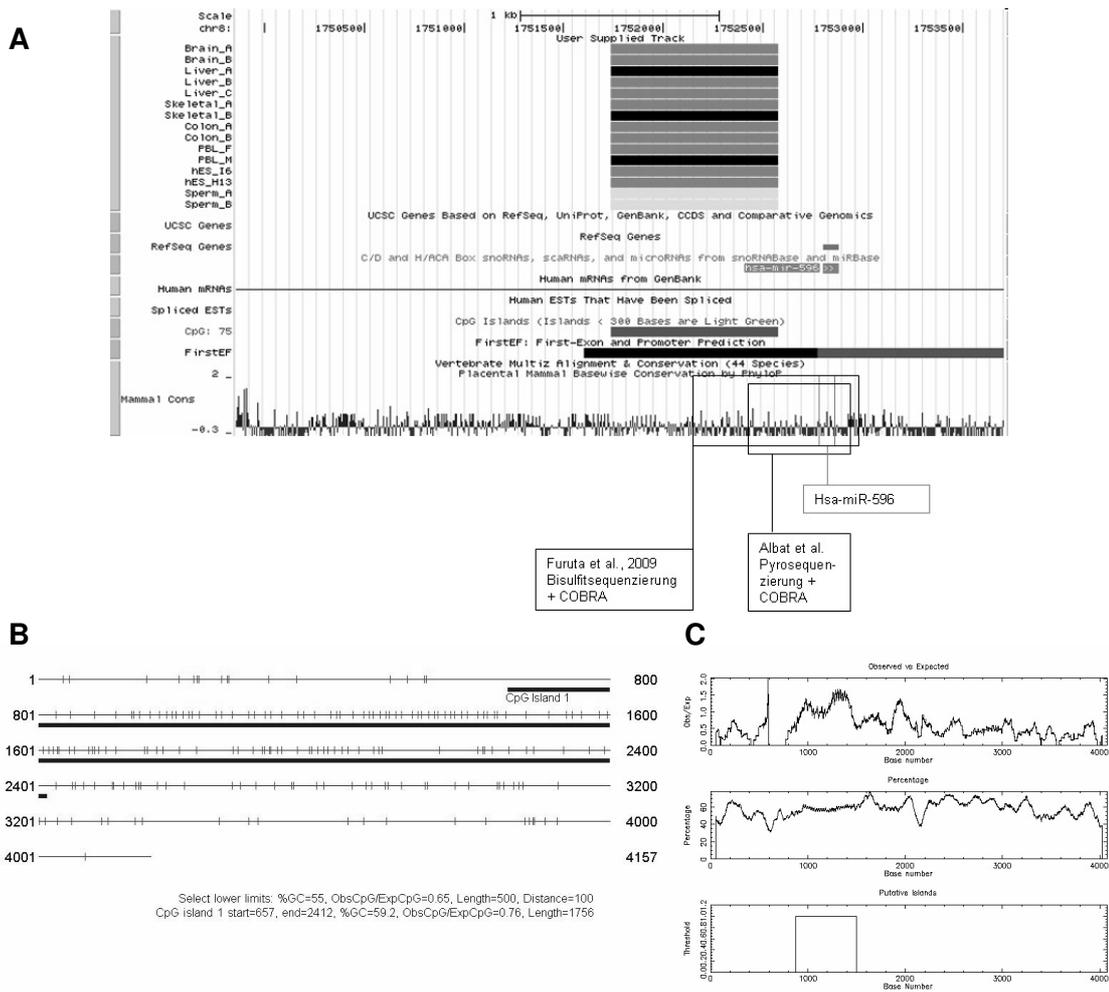


Abbildung 69 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-miR-596. (A) Darstellung des Methylierungsgrades der untersuchten CpG-Insel: grün= unmethyliert, schwarz= unbestimmt, rot= methyliert (Straussman et al., 2009); Lage von Genen und mRNAs (breite Balken= Exons, dünne Linien= Introns); putative CpG-Inseln (grüne Balken; hellgrüne Balken= <300bp Länge); Regulationsmechanismen aus FirstEF (schwarze Balken= putative Promotoren, CpG-Inseln und erste Exons); Konservierung in 17 Mammalia (blaue Histogrammfläche); (B) putative CpG-Insel nach Vorhersage mit *CpG-Island Searcher* (blaue Balken= CpG-Inseln; rote Striche= CpG-Dinukleotide; schwarze Linie= DNA-Sequenz (bp)); (C) putative CpG-Insel nach Vorhersage mit *CpGplot* (von oben nach unten: Kurven für das Verhältnis von beobachteten zu erwarteten CpG-Dinukleotiden, GC-Gehalt; CpG-Inseln (schwarz umrandete Box)).

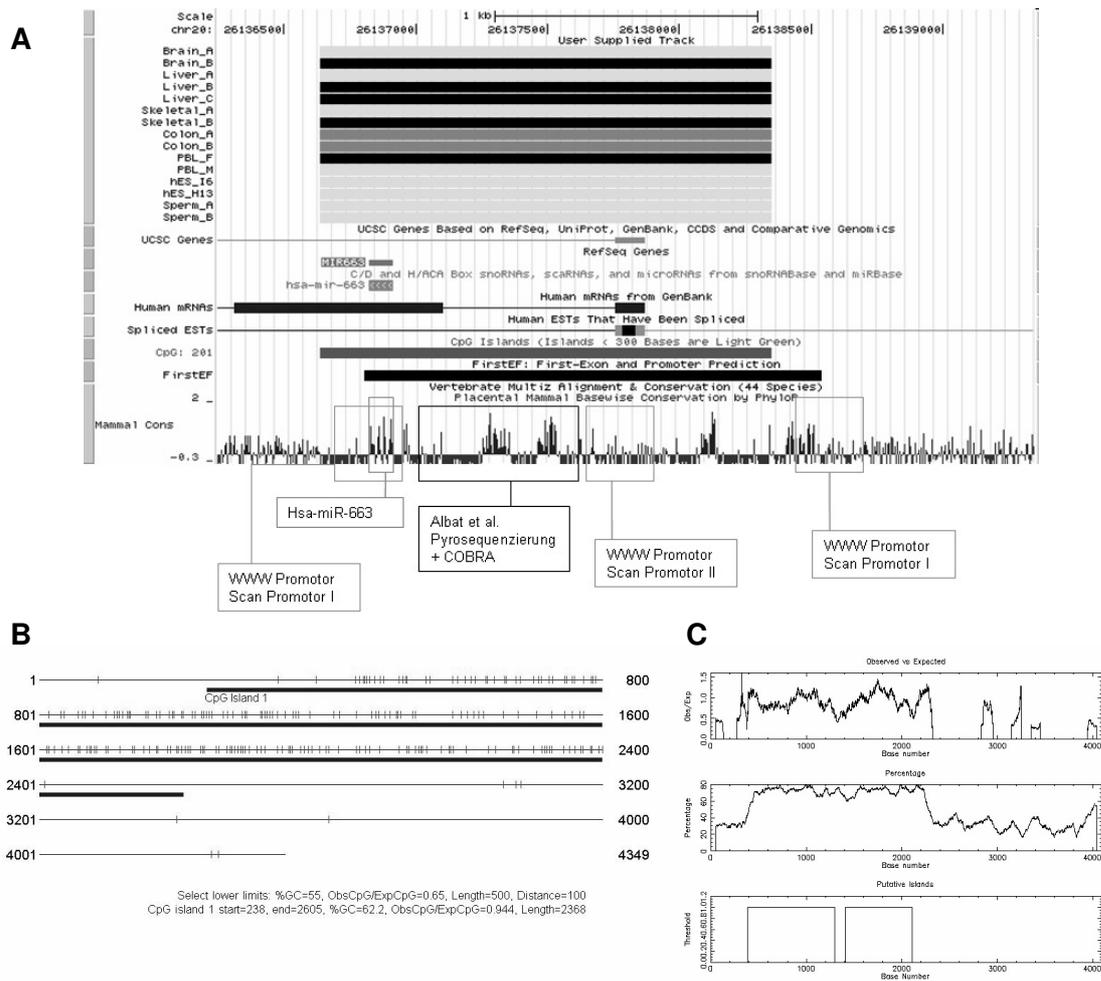


Abbildung 70 Regulation, Methylierung und Konservierung von Hsa-mir-663. (A) Darstellung des Methylierungsgrades der untersuchten CpG-Insel: grün= unmethyliert, schwarz= unbestimmt, rot= methyliert (Straussman et al., 2009); Lage von Genen und mRNAs (breite Balken= Exons, dünne Linien= Introns); putative CpG-Inseln (grüne Balken; hellgrüne Balken= <300bp Länge); Regulationsmechanismen aus FirstEF (schwarze Balken= putative Promotoren, CpG-Inseln und erste Exons); Konservierung in 17 Mammalia (blaue Histogrammfläche); (B) putative CpG-Insel nach Vorhersage mit *CpG-Island Searcher* (blaue Balken= CpG-Inseln; rote Striche= CpG-Dinukleotide; schwarze Linie= DNA-Sequenz (bp)); (C) putative CpG-Insel nach Vorhersage mit *CpGplot* (von oben nach unten: Kurven für das Verhältnis von beobachteten zu erwarteten CpG-Dinukleotiden, GC-Gehalt; CpG-Inseln (schwarz umrandete Box)).

Anhang B: GO-Kategorisierung der Zielgene der microRNA-Kandidaten

Die Zielgene von Hsa-mir-596 ließen sich nicht in Stoffwechselwege gruppieren. Daher wurden nur die zehn häufigsten biologischen Prozesse dargestellt, die nach ihrem p-Wert sortiert sind.

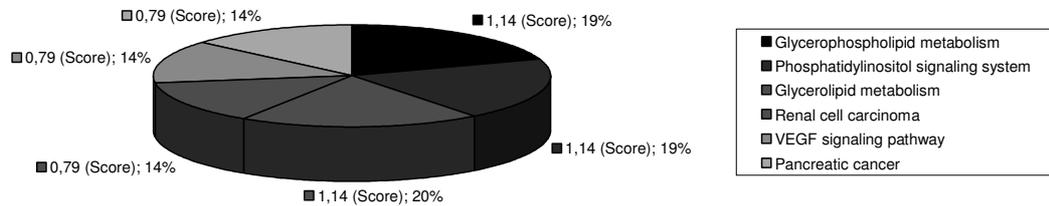


Abbildung 71 Verteilung des *Enrichment Score* der Stoffwechselwege der putativen Zielgene von Hsa-mir-1. In der Legende sind die Stoffwechselwege und Krankheiten der involvierten Gene verzeichnet.

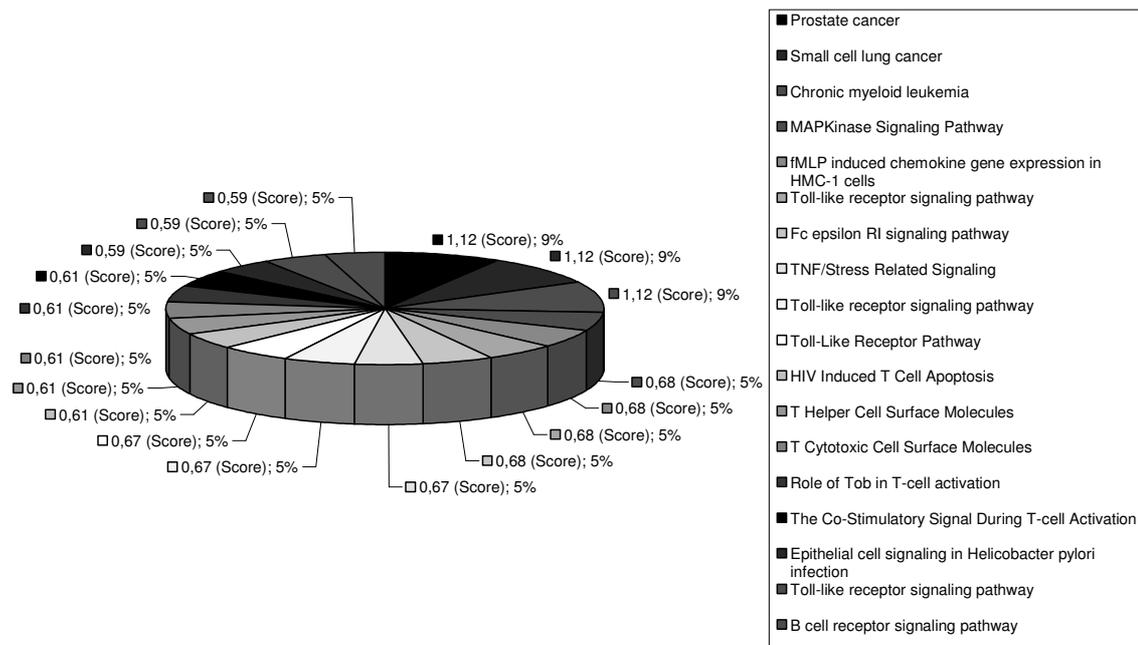


Abbildung 72 Verteilung des *Enrichment Score* der Stoffwechselwege der putativen Zielgene von Hsa-mir-34a. In der Legende sind die Stoffwechselwege und Krankheiten der involvierten Gene verzeichnet.

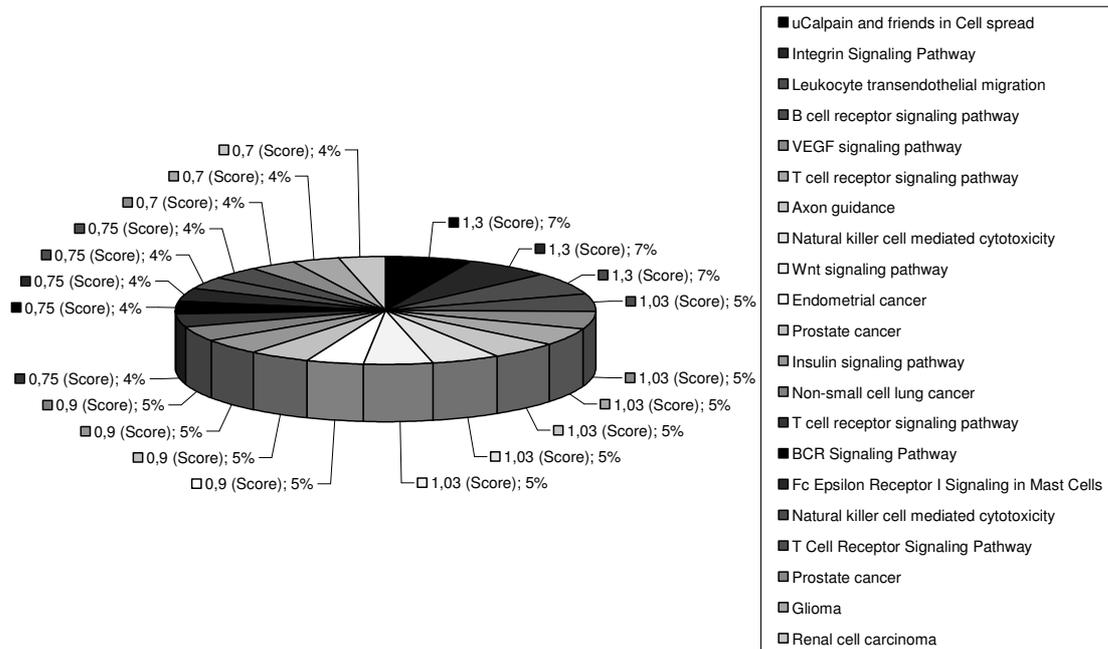


Abbildung 73 Verteilung des *Enrichment Score* der Stoffwechselwege der putativen Zielgene von Hsa-mir-34b. In der Legende sind die Stoffwechselwege und Krankheiten der involvierten Gene verzeichnet.

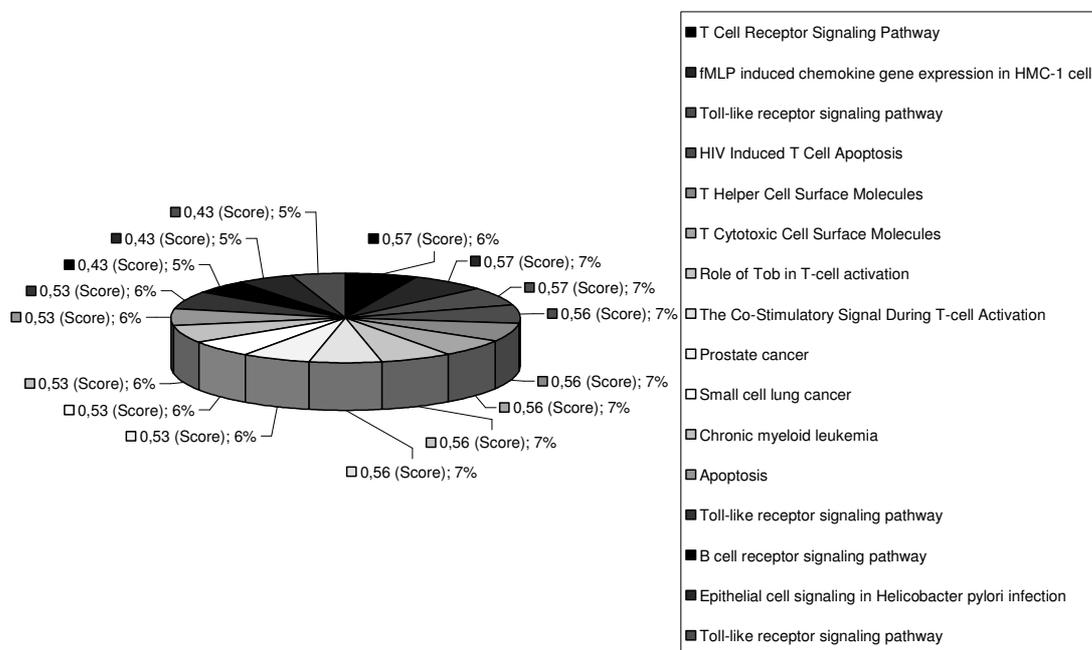


Abbildung 74 Verteilung des *Enrichment Score* der Stoffwechselwege der putativen Zielgene von Hsa-mir-34c. In der Legende sind die Stoffwechselwege und Krankheiten der involvierten Gene verzeichnet.

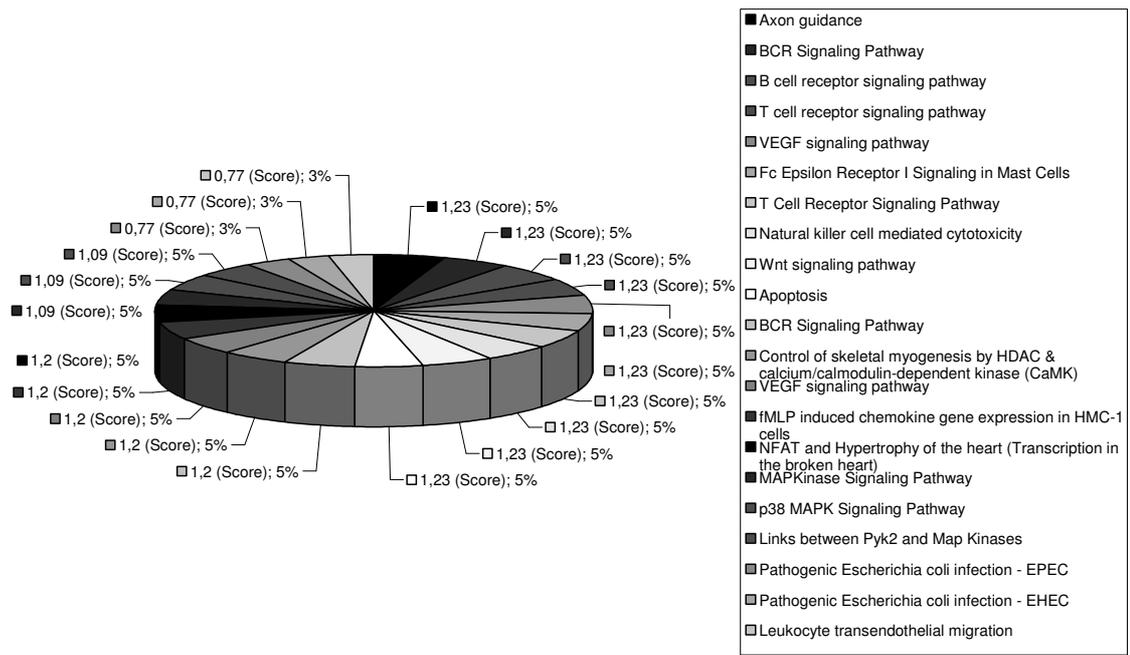


Abbildung 75 Verteilung des *Enrichment Score* der Stoffwechselwege der putativen Zielgene von Hsa-mir-124. In der Legende sind die Stoffwechselwege und Krankheiten der involvierten Gene verzeichnet.

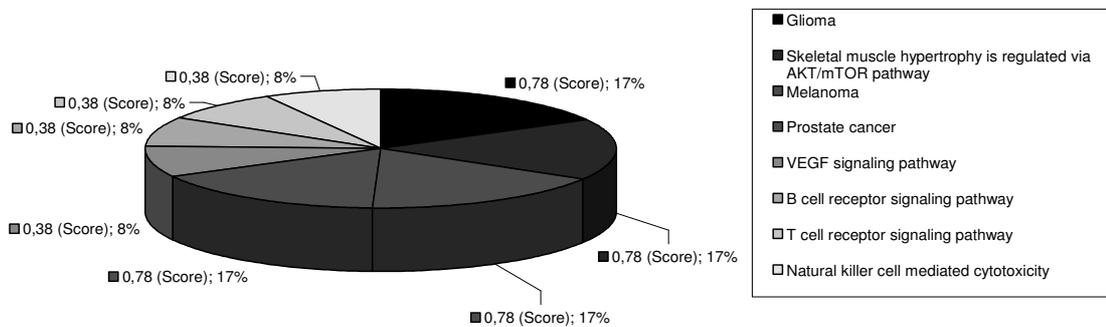


Abbildung 76 Verteilung des *Enrichment Score* der Stoffwechselwege der putativen Zielgene von Hsa-mir-148a. In der Legende sind die Stoffwechselwege und Krankheiten der involvierten Gene verzeichnet.

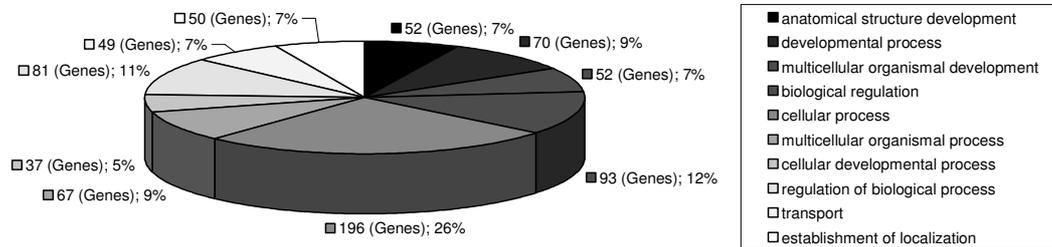


Abbildung 77 Verteilung der zehn häufigsten biologischen Prozesse der putativen Zielgene von Hsa-mir-596. In der Legende sind die Prozesse und Regulationswege der involvierten Gene verzeichnet.

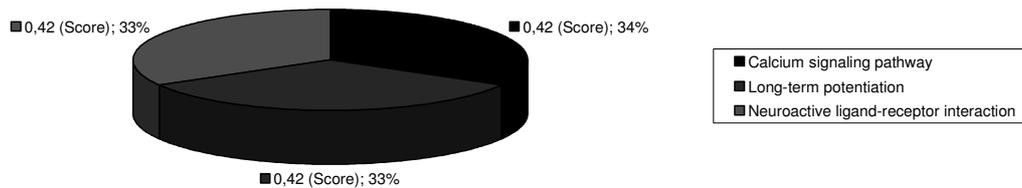


Abbildung 78 Verteilung des *Enrichment Score* der Stoffwechselwege der putativen Zielgene von Hsa-mir-663. In der Legende sind die Stoffwechselwege und Krankheiten der involvierten Gene verzeichnet.

Literaturverzeichnis

- Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., and Knowles, B. B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* *282*, 615-616.
- Aerts, S., Thijs, G., Dabrowski, M., Moreau, Y., and De Moor, B. (2004). Comprehensive analysis of the base composition around the transcription start site in Metazoa. *BMC Genomics* *5*, 34.
- Agirre, X., Vilas-Zornoza, A., Jimenez-Velasco, A., Martin-Subero, J. I., Cordeu, L., Garate, L., San Jose-Eneriz, E., Abizanda, G., Rodriguez-Otero, P., Fortes, P., *et al.* (2009). Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* *69*, 4443-4453.
- Ambros, V. (2001). microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* *107*, 823-826.
- Arai, E., Ushijima, S., Gotoh, M., Ojima, H., Kosuge, T., Hosoda, F., Shibata, T., Kondo, T., Yokoi, S., Imoto, I., *et al.* (2009). Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* *125*, 2854-2862.
- Badvie, S. (2000). Hepatocellular carcinoma. *Postgrad Med J* *76*, 4-11.
- Bala, S., Marcos, M., and Szabo, G. (2009). Emerging role of microRNAs in liver diseases. *World J Gastroenterol* *15*, 5633-5640.
- Baylin, S. B., Hoppener, J. W., de Bustros, A., Steenbergh, P. H., Lips, C. J., and Nelkin, B. D. (1986). DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. *Cancer Res* *46*, 2917-2922.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* *7*, 1513-1523.
- Blanchette, M., Kent, W. J., Riemer, C., Elnitski, L., Smit, A. F., Roskin, K. M., Baertsch, R., Rosenbloom, K., Clawson, H., Green, E. D., *et al.* (2004). Aligning multiple genomic sequences with the threaded blockset aligner. *Genome Res* *14*, 708-715.
- Boozari, B., and Kubicka, S. (2010). [Differentiated therapy of liver tumors]. *Internist (Berl)* *51*, 53-62.
- Brown, T., Mackey, K., and Du, T. (2004). Analysis of RNA by northern and slot blot hybridization. *Curr Protoc Mol Biol Chapter 4*, Unit 4 9.
- Bruix, J., Boix, L., Sala, M., and Llovet, J. M. (2004). Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* *5*, 215-219.
- Bucher, P., and Trifonov, E. N. (1986). Compilation and analysis of eukaryotic POL II promoter sequences. *Nucleic Acids Res* *14*, 10009-10026.
- Budhu, A., Jia, H. L., Forgues, M., Liu, C. G., Goldstein, D., Lam, A., Zanetti, K. A., Ye, Q. H., Qin, L. X., Croce, C. M., *et al.* (2008). Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* *47*, 897-907.
- Cai, X., Hagedorn, C. H., and Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna* *10*, 1957-1966.

- Cailleau, R., Young, R., Olive, M., and Reeves, W. J., Jr. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* *53*, 661-674.
- Calin, G. A., and Croce, C. M. (2006). MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res* *66*, 7390-7394.
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., *et al.* (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 15524-15529.
- Calvisi, D. F., Ladu, S., Gorden, A., Farina, M., Lee, J. S., Conner, E. A., Schroeder, I., Factor, V. M., and Thorgeirsson, S. S. (2007). Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* *117*, 2713-2722.
- Chaudhuri, K., and Chatterjee, R. (2007). MicroRNA detection and target prediction: integration of computational and experimental approaches. *DNA Cell Biol* *26*, 321-337.
- Chen, R. Z., Pettersson, U., Beard, C., Jackson-Grusby, L., and Jaenisch, R. (1998). DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* *395*, 89-93.
- Chiaromonte, F., Yap, V. B., and Miller, W. (2002). Scoring pairwise genomic sequence alignments. *Pac Symp Biocomput*, 115-126.
- Corcoran, D. L., Pandit, K. V., Gordon, B., Bhattacharjee, A., Kaminski, N., and Benos, P. V. (2009). Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data. *PLoS One* *4*, e5279.
- Datta, J., Kutay, H., Nasser, M. W., Nuovo, G. J., Wang, B., Majumder, S., Liu, C. G., Volinia, S., Croce, C. M., Schmittgen, T. D., *et al.* (2008). Methylation mediated silencing of MicroRNA-1 gene and its role in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res* *68*, 5049-5058.
- Davuluri, R. V., Grosse, I., and Zhang, M. Q. (2001). Computational identification of promoters and first exons in the human genome. *Nat Genet* *29*, 412-417.
- Dennis, G., Jr., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C., and Lempicki, R. A. (2003). DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* *4*, P3.
- Dor, I., Namba, M., and Sato, J. (1975). Establishment and some biological characteristics of human hepatoma cell lines. *Gann* *66*, 385-392.
- Doran, J., and Strauss, W. M. (2007). Bio-informatic trends for the determination of miRNA-target interactions in mammals. *DNA Cell Biol* *26*, 353-360.
- Duursma, A. M., Kedde, M., Schrier, M., le Sage, C., and Agami, R. (2008). miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *Rna* *14*, 872-877.
- Eads, C. A., Danenberg, K. D., Kawakami, K., Saltz, L. B., Blake, C., Shibata, D., Danenberg, P. V., and Laird, P. W. (2000). MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* *28*, E32.
- Ehrich, M., Nelson, M. R., Stanssens, P., Zabeau, M., Liloglou, T., Xinarianos, G., Cantor, C. R., Field, J. K., and van den Boom, D. (2005). Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 15785-15790.
- Engel, L. W., Young, N. A., Tralka, T. S., Lippman, M. E., O'Brien, S. J., and Joyce, M. J. (1978). Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. *Cancer Res* *38*, 3352-3364.
- Farazi, P. A., and DePinho, R. A. (2006). Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* *6*, 674-687.

- Feitelson, M. A., Sun, B., Satiroglu Tufan, N. L., Liu, J., Pan, J., and Lian, Z. (2002). Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* *21*, 2593-2604.
- Ferretti, E., De Smaele, E., Po, A., Di Marcotullio, L., Tosi, E., Espinola, M. S., Di Rocco, C., Riccardi, R., Giangaspero, F., Farcomeni, A., *et al.* (2009). MicroRNA profiling in human medulloblastoma. *Int J Cancer* *124*, 568-577.
- Fogh, J., Wright, W. C., and Loveless, J. D. (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* *58*, 209-214.
- Fraga, M. F., Agrelo, R., and Esteller, M. (2007). Cross-talk between aging and cancer: the epigenetic language. *Ann N Y Acad Sci* *1100*, 60-74.
- Frohman, M. A. (1993). Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of full-length complementary DNAs: thermal RACE. *Methods Enzymol* *218*, 340-356.
- Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Molloy, P. L., and Paul, C. L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 1827-1831.
- Fujita, S., and Iba, H. (2008). Putative promoter regions of miRNA genes involved in evolutionarily conserved regulatory systems among vertebrates. *Bioinformatics* *24*, 303-308.
- Fukao, T., Fukuda, Y., Kiga, K., Sharif, J., Hino, K., Enomoto, Y., Kawamura, A., Nakamura, K., Takeuchi, T., and Tanabe, M. (2007). An evolutionarily conserved mechanism for microRNA-223 expression revealed by microRNA gene profiling. *Cell* *129*, 617-631.
- Furuta, M., Kozaki, K. I., Tanaka, S., Arai, S., Imoto, I., and Inazawa, J. (2009). miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*.
- Gao, W., Kondo, Y., Shen, L., Shimizu, Y., Sano, T., Yamao, K., Natsume, A., Goto, Y., Ito, M., Murakami, H., *et al.* (2008). Variable DNA methylation patterns associated with progression of disease in hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis* *29*, 1901-1910.
- Gardiner-Garden, M., and Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* *196*, 261-282.
- Gaudet, F., Hodgson, J. G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J. W., Leonhardt, H., and Jaenisch, R. (2003). Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* *300*, 489-492.
- Gebhard, C., Benner, C., Ehrich, M., Schwarzfischer, L., Schilling, E., Klug, M., Dietmaier, W., Thiede, C., Holler, E., Andreesen, R., and Rehli, M. (2010). General transcription factor binding at CpG islands in normal cells correlates with resistance to de novo DNA methylation in cancer cells. *Cancer Res* *70*, 1398-1407.
- Gioanni, J., Le Francois, D., Zanghellini, E., Mazeau, C., Ettore, F., Lambert, J. C., Schneider, M., and Dutrillaux, B. (1990). Establishment and characterisation of a new tumorigenic cell line with a normal karyotype derived from a human breast adenocarcinoma. *Br J Cancer* *62*, 8-13.
- Gramantieri, L., Fornari, F., Ferracin, M., Veronese, A., Sabbioni, S., Calin, G. A., Grazi, G. L., Croce, C. M., Bolondi, L., and Negrini, M. (2009). MicroRNA-221 targets Bmf in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality. *Clin Cancer Res* *15*, 5073-5081.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S., Bateman, A., and Enright, A. J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* *34*, D140-144.

- Gu, J., He, T., Pei, Y., Li, F., Wang, X., Zhang, J., Zhang, X., and Li, Y. (2006). Primary transcripts and expressions of mammal intergenic microRNAs detected by mapping ESTs to their flanking sequences. *Mamm Genome* 17, 1033-1041.
- Guil, S., and Esteller, M. (2009). DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 87-95.
- Guimbellot, J. S., Erickson, S. W., Mehta, T., Wen, H., Page, G. P., Sorscher, E. J., and Hong, J. S. (2009). Correlation of microRNA levels during hypoxia with predicted target mRNAs through genome-wide microarray analysis. *BMC Med Genomics* 2, 15.
- Gusev, Y. (2008). Computational methods for analysis of cellular functions and pathways collectively targeted by differentially expressed microRNA. *Methods* 44, 61-72.
- Hackanson, B., Bennett, K. L., Brena, R. M., Jiang, J., Claus, R., Chen, S. S., Blagitko-Dorfs, N., Maharry, K., Whitman, S. P., Schmittgen, T. D., *et al.* (2008). Epigenetic modification of CCAAT/enhancer binding protein alpha expression in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 68, 3142-3151.
- Hada, H., Koide, N., Morita, T., Shiraha, H., Shinji, T., Nakamura, M., Ujike, K., Takayama, N., Oka, T., Hanafusa, T., *et al.* (1996). Promoter-independent loss of mRNA and protein of the Rb gene in a human hepatocellular carcinoma. *Hepato-gastroenterology* 43, 1185-1189.
- Hao-Xiang, T., Qian, W., Lian-Zhou, C., Xiao-Hui, H., Jin-Song, C., Xin-Hui, F., Liang-Qi, C., Xi-Ling, C., Wen, L., and Long-Juan, Z. (2009). MicroRNA-9 reduces cell invasion and E-cadherin secretion in SK-Hep-1 cell. *Med Oncol*.
- Harmer, M., Denoix, P., and Hamperl, H. (1970). The TNM-system. *Aktuelle Probl Chir* 14, 25-36.
- Harris, C. C. (1991). Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res* 51, 5023s-5044s.
- Hausser, J., Berninger, P., Rodak, C., Jantscher, Y., Wirth, S., and Zavolan, M. (2009). MirZ: an integrated microRNA expression atlas and target prediction resource. *Nucleic Acids Res* 37, W266-272.
- He, L., and Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5, 522-531.
- He, L., He, X., Lim, L. P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., *et al.* (2007a). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447, 1130-1134.
- He, X., He, L., and Hannon, G. J. (2007b). The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network. *Cancer Res* 67, 11099-11101.
- Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D., and Baylin, S. B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9821-9826.
- Hermeking, H. (2010). The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ* 17, 193-199.
- Hsu, P. W., Huang, H. D., Hsu, S. D., Lin, L. Z., Tsou, A. P., Tseng, C. P., Stadler, P. F., Washietl, S., and Hofacker, I. L. (2006). miRNAMap: genomic maps of microRNA genes and their target genes in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res* 34, D135-139.
- Huang da, W., Sherman, B. T., and Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4, 44-57.
- Huang, J. (2009). Current progress in epigenetic research for hepatocarcinogenesis. *Sci China C Life Sci* 52, 31-42.

- Huang, X. H., Wang, Q., Chen, J. S., Fu, X. H., Chen, X. L., Chen, L. Z., Li, W., Bi, J., Zhang, L. J., Fu, Q., *et al.* (2009). Bead-based microarray analysis of microRNA expression in hepatocellular carcinoma: miR-338 is downregulated. *Hepatol Res* 39, 786-794.
- Issa, J. P. (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 988-993.
- Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M., and Haussler, D. (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 12, 996-1006.
- Koeffler, H. P., Billing, R., Lusic, A. J., Sparkes, R., and Golde, D. W. (1980). An undifferentiated variant derived from the human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1). *Blood* 56, 265-273.
- Kozaki, K., Imoto, I., Mogi, S., Omura, K., and Inazawa, J. (2008). Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res* 68, 2094-2105.
- Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N. (2004). *Pathologic Basis of Disease*, 7th edn (Philadelphia, USA, Elsevier GmbH, Saunders).
- Kurebayashi, J., Kurosumi, M., and Sonoo, H. (1995). A new human breast cancer cell line, KPL-1 secretes tumour-associated antigens and grows rapidly in female athymic nude mice. *Br J Cancer* 71, 845-853.
- Ladeiro, Y., Couchy, G., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P., Pelletier, L., Rebouissou, S., and Zucman-Rossi, J. (2008). MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology* 47, 1955-1963.
- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A. O., Landthaler, M., *et al.* (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129, 1401-1414.
- Larsen, F., Gundersen, G., Lopez, R., and Prydz, H. (1992). CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* 13, 1095-1107.
- Lauss, M., Visne, I., Weinhaeusel, A., Vierlinger, K., Noehammer, C., and Kriegner, A. (2008). MethCancerDB--aberrant DNA methylation in human cancer. *Br J Cancer* 98, 816-817.
- Lavanchy, D. (2004). Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* 11, 97-107.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- Lehmann, U., Albat, C. and Kreipe, H. (in press). High-resolution quantitative methylation analysis of microRNA genes using Pyrosequencing™. In *Metastasis Research Protocols*, S. Brooks, M. Dwek, U. Schumacher, ed. (Berlin, Germany, Springer Science+Business Media Deutschland GmbH).
- Lehmann, U., Hasemeier, B., Christgen, M., Muller, M., Romermann, D., Langer, F., and Kreipe, H. (2008). Epigenetic inactivation of microRNA gene *hsa-mir-9-1* in human breast cancer. *J Pathol* 214, 17-24.
- Lehmann, U., and Kreipe, H. (2001). Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods* 25, 409-418.
- Lehmann, U., Wingen, L. U., Brakensiek, K., Wedemeyer, H., Becker, T., Heim, A., Metzger, K., Hasemeier, B., Kreipe, H., and Flemming, P. (2007). Epigenetic defects of

- hepatocellular carcinoma are already found in non-neoplastic liver cells from patients with hereditary haemochromatosis. *Hum Mol Genet* *16*, 1335-1342.
- Leiva, I. M., Emmert-Buck, M. R., and Gillespie, J. W. (2003). Handling of clinical tissue specimens for molecular profiling studies. *Curr Issues Mol Biol* *5*, 27-35.
- Li, L., Xu, J., Yang, D., Tan, X., and Wang, H. (2009a). Computational approaches for microRNA studies: a review. *Mamm Genome*.
- Li, N., Fu, H., Tie, Y., Hu, Z., Kong, W., Wu, Y., and Zheng, X. (2009b). miR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* *275*, 44-53.
- Lin, C. H., Hsieh, S. Y., Sheen, I. S., Lee, W. C., Chen, T. C., Shyu, W. C., and Liaw, Y. F. (2001). Genome-wide hypomethylation in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res* *61*, 4238-4243.
- Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J. R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q. M., *et al.* (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* *462*, 315-322.
- Liu, N., Williams, A. H., Kim, Y., McAnally, J., Bezprozvannaya, S., Sutherland, L. B., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., and Olson, E. N. (2007). An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 20844-20849.
- Liu, S., Chan, K. W., Wang, B., and Qiao, L. (2009a). Fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* *104*, 2617-2624; quiz 2625.
- Liu, W. H., Yeh, S. H., Lu, C. C., Yu, S. L., Chen, H. Y., Lin, C. Y., Chen, D. S., and Chen, P. J. (2009b). MicroRNA-18a prevents estrogen receptor-alpha expression, promoting proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Gastroenterology* *136*, 683-693.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* *25*, 402-408.
- Lodygin, D., Tarasov, V., Epanchintsev, A., Berking, C., Knyazeva, T., Korner, H., Knyazev, P., Diebold, J., and Hermeking, H. (2008). Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle* *7*, 2591-2600.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., *et al.* (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* *435*, 834-838.
- Lu, L., Katsaros, D., de la Longrais, I. A., Sochirca, O., and Yu, H. (2007). Hypermethylation of let-7a-3 in epithelial ovarian cancer is associated with low insulin-like growth factor-II expression and favorable prognosis. *Cancer Res* *67*, 10117-10122.
- Lujambio, A., Calin, G. A., Villanueva, A., Ropero, S., Sanchez-Cespedes, M., Blanco, D., Montuenga, L. M., Rossi, S., Nicoloso, M. S., Faller, W. J., *et al.* (2008). A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 13556-13561.
- Lujambio, A., and Esteller, M. (2007). CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer. *Cell Cycle* *6*, 1455-1459.
- Lujambio, A., and Esteller, M. (2009). How epigenetics can explain human metastasis: a new role for microRNAs. *Cell Cycle* *8*, 377-382.
- Lujambio, A., Ropero, S., Ballestar, E., Fraga, M. F., Cerrato, C., Setien, F., Casado, S., Suarez-Gauthier, A., Sanchez-Cespedes, M., Git, A., *et al.* (2007). Genetic unmask-

- ing of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 67, 1424-1429.
- Luna, L. G., HT(ASCP), ed. (1960). *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, 3rd edn (New York, USA, American Registry of Pathology, McGraw Hill Publishers).
- Makeyev, E. V., Zhang, J., Carrasco, M. A., and Maniatis, T. (2007). The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 27, 435-448.
- Makunin, I. V., Pheasant, M., Simons, C., and Mattick, J. S. (2007). Orthologous microRNA genes are located in cancer-associated genomic regions in human and mouse. *PLoS One* 2, e1133.
- Marcaud, L., Reynaud, C. A., Therwath, A., and Scherrer, K. (1981). Modification of the methylation pattern in the vicinity of the chicken globin genes in avian erythroblastosis virus transformed cells. *Nucleic Acids Res* 9, 1841-1851.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y. J., Chen, Z., *et al.* (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437, 376-380.
- Marshall, O. J. (2004). PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 20, 2471-2472.
- Maston, G. A., Evans, S. K., and Green, M. R. (2006). Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7, 29-59.
- McAllister, R. M., Isaacs, H., Rongey, R., Peer, M., Au, W., Soukup, S. W., and Gardner, M. B. (1977). Establishment of a human medulloblastoma cell line. *Int J Cancer* 20, 206-212.
- McClain, C. J., Hill, D. B., Song, Z., Deaciuc, I., and Barve, S. (2002). Monocyte activation in alcoholic liver disease. *Alcohol* 27, 53-61.
- Megraw, M., Pereira, F., Jensen, S. T., Ohler, U., and Hatzigeorgiou, A. G. (2009). A transcription factor affinity-based code for mammalian transcription initiation. *Genome Res* 19, 644-656.
- Migliore, C., Petrelli, A., Ghiso, E., Corso, S., Capparuccia, L., Eramo, A., Comoglio, P. M., and Giordano, S. (2008). MicroRNAs impair MET-mediated invasive growth. *Cancer Res* 68, 10128-10136.
- Mocellin, S., and Rossi, C. R. (2008). The melanoma molecular map project. *Melanoma Res* 18, 163-165.
- Muller, H. J., and Altenburg, E. (1930). The Frequency of Translocations Produced by X-Rays in *Drosophila*. *Genetics* 15, 283-311.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., and Sato, J. (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 42, 3858-3863.
- Nam, S., Kim, B., Shin, S., and Lee, S. (2008). miRGator: an integrated system for functional annotation of microRNAs. *Nucleic Acids Res* 36, D159-164.
- Navon, R., Wang, H., Steinfeld, I., Tsalenko, A., Ben-Dor, A., and Yakhini, Z. (2009). Novel rank-based statistical methods reveal microRNAs with differential expression in multiple cancer types. *PLoS One* 4, e8003.
- Ongenaert, M., Van Neste, L., De Meyer, T., Menschaert, G., Bekaert, S., and Van Criekinge, W. (2008). PubMeth: a cancer methylation database combining text-mining and expert annotation. *Nucleic Acids Res* 36, D842-846.

- Osada, H., and Takahashi, T. (2007). MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 28, 2-12.
- Papadopoulos, G. L., Reczko, M., Simossis, V. A., Sethupathy, P., and Hatzigeorgiou, A. G. (2009). The database of experimentally supported targets: a functional update of TarBase. *Nucleic Acids Res* 37, D155-158.
- Paris, R., Henry, R. E., Stephens, S. J., McBryde, M., and Espinosa, J. M. (2008). Multiple p53-independent gene silencing mechanisms define the cellular response to p53 activation. *Cell Cycle* 7, 2427-2433.
- Park, I. Y., Sohn, B. H., Yu, E., Suh, D. J., Chung, Y. H., Lee, J. H., Surzycki, S. J., and Lee, Y. I. (2007). Aberrant epigenetic modifications in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein. *Gastroenterology* 132, 1476-1494.
- Peng, D. F., Kanai, Y., Sawada, M., Ushijima, S., Hiraoka, N., Kitazawa, S., and Hirohashi, S. (2006). DNA methylation of multiple tumor-related genes in association with overexpression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) during multistage carcinogenesis of the pancreas. *Carcinogenesis* 27, 1160-1168.
- Peterson, E. J., Bogler, O., and Taylor, S. M. (2003). p53-mediated repression of DNA methyltransferase 1 expression by specific DNA binding. *Cancer Res* 63, 6579-6582.
- Pierson, J., Hostager, B., Fan, R., and Vibhakar, R. (2008). Regulation of cyclin dependent kinase 6 by microRNA 124 in medulloblastoma. *J Neurooncol* 90, 1-7.
- Pineau, P., Volinia, S., McJunkin, K., Marchio, A., Battiston, C., Terris, B., Mazzaferro, V., Lowe, S. W., Croce, C. M., and Dejean, A. (2009). miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 264-269.
- Prestridge, D. S. (1995). Predicting Pol II promoter sequences using transcription factor binding sites. *J Mol Biol* 249, 923-932.
- Pulvertaft, J. V. (1964). Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet* 1, 238-240.
- Reik, W., and Walter, J. (2001). Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2, 21-32.
- Rhead, B., Karolchik, D., Kuhn, R. M., Hinrichs, A. S., Zweig, A. S., Fujita, P. A., Diekhans, M., Smith, K. E., Rosenbloom, K. R., Raney, B. J., *et al.* (2010). The UCSC Genome Browser database: update 2010. *Nucleic Acids Res* 38, D613-619.
- Ritchie, W., Flamant, S., and Rasko, J. E. (2009). Predicting microRNA targets and functions: traps for the unwary. *Nat Methods* 6, 397-398.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14, 1902-1910.
- Roman-Gomez, J., Agirre, X., Jimenez-Velasco, A., Arqueros, V., Vilas-Zornoza, A., Rodriguez-Otero, P., Martin-Subero, I., Garate, L., Cordeu, L., San Jose-Eneriz, E., *et al.* (2009). Epigenetic regulation of microRNAs in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 27, 1316-1322.
- Ronaghi, M., Uhlen, M., and Nyren, P. (1998). A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281, 363, 365.
- Saini, H. K., Griffiths-Jones, S., and Enright, A. J. (2007). Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17719-17724.
- Saito, Y., Kanai, Y., Nakagawa, T., Sakamoto, M., Saito, H., Ishii, H., and Hirohashi, S. (2003). Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer* 105, 527-532.

- Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J. M., Chuang, J. C., Coetzee, G. A., and Jones, P. A. (2006). Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 9, 435-443.
- Sambrook J., F. E. F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edn (New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Selbach, M., Schwanhauser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., and Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455, 58-63.
- Sethupathy, P., Megraw, M., and Hatzigeorgiou, A. G. (2006). A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets. *Nat Methods* 3, 881-886.
- Sharma, S., Kelly, T. K., and Jones, P. A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31, 27-36.
- Shen, L., Ahuja, N., Shen, Y., Habib, N. A., Toyota, M., Rashid, A., and Issa, J. P. (2002). DNA methylation and environmental exposures in human hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 94, 755-761.
- Shendure, J., and Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 26, 1135-1145.
- Siepel, A., Haussler, D (2005). Phylogenetic hidden Markov models. In *Statistical Methods in Molecular Evolution*, R. Nielsen, ed. (New York, USA, Springer), pp. 325-351.
- Silber, J., Lim, D. A., Petritsch, C., Persson, A. I., Maunakea, A. K., Yu, M., Vandenberg, S. R., Ginzinger, D. G., James, C. D., Costello, J. F., *et al.* (2008). miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med* 6, 14.
- Sleutels, F., and Barlow, D. P. (2002). The origins of genomic imprinting in mammals. *Adv Genet* 46, 119-163.
- Smirnova, L., Grafe, A., Seiler, A., Schumacher, S., Nitsch, R., and Wulczyn, F. G. (2005). Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci* 21, 1469-1477.
- Straussman, R., Nejman, D., Roberts, D., Steinfeld, I., Blum, B., Benvenisty, N., Simon, I., Yakhini, Z., and Cedar, H. (2009). Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nat Struct Mol Biol* 16, 564-571.
- Takai, D., and Jones, P. A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3740-3745.
- Tannapfel, A. (2006). [Methylation and other new concepts for the origin of hepatocellular carcinoma]. *Pathologe* 27, 284-288.
- Tarasov, V., Jung, P., Verdoodt, B., Lodygin, D., Epanchintsev, A., Menssen, A., Meister, G., and Hermeking, H. (2007). Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle* 6, 1586-1593.
- Teodoridis, J. M., Hardie, C., and Brown, R. (2008). CpG island methylator phenotype (CIMP) in cancer: causes and implications. *Cancer Lett* 268, 177-186.
- Tost, J., Schatz, P., Schuster, M., Berlin, K., and Gut, I. G. (2003). Analysis and accurate quantification of CpG methylation by MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* 31, e50.

- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G., Baylin, S. B., and Issa, J. P. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 8681-8686.
- Toyota, M., Suzuki, H., Sasaki, Y., Maruyama, R., Imai, K., Shinomura, Y., and Tokino, T. (2008). Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res* *68*, 4123-4132.
- Trinklein, N. D., Aldred, S. J., Saldanha, A. J., and Myers, R. M. (2003). Identification and functional analysis of human transcriptional promoters. *Genome Res* *13*, 308-312.
- Uhlmann, K., Brinckmann, A., Toliat, M. R., Ritter, H., and Nurnberg, P. (2002). Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis. *Electrophoresis* *23*, 4072-4079.
- Ura, S., Honda, M., Yamashita, T., Ueda, T., Takatori, H., Nishino, R., Sunakozaka, H., Sakai, Y., Horimoto, K., and Kaneko, S. (2009). Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* *49*, 1098-1112.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J. A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* *318*, 1931-1934.
- Visvanathan, J., Lee, S., Lee, B., Lee, J. W., and Lee, S. K. (2007). The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev* *21*, 744-749.
- Wang, X. (2006). Systematic identification of microRNA functions by combining target prediction and expression profiling. *Nucleic Acids Res* *34*, 1646-1652.
- Wang, X. (2008). miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *Rna* *14*, 1012-1017.
- Wang, X., and El Naqa, I. M. (2008). Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals. *Bioinformatics* *24*, 325-332.
- Wang, Y., Lee, A. T., Ma, J. Z., Wang, J., Ren, J., Yang, Y., Tantoso, E., Li, K. B., Ooi, L. L., Tan, P., and Lee, C. G. (2008). Profiling microRNA expression in hepatocellular carcinoma reveals microRNA-224 up-regulation and apoptosis inhibitor-5 as a microRNA-224-specific target. *J Biol Chem* *283*, 13205-13215.
- Weber, B., Stresemann, C., Brueckner, B., and Lyko, F. (2007). Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle* *6*, 1001-1005.
- Welsch, U. (2006). *Lehrbuch Histologie*, 2nd edn (München, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag).
- Wu, L., Fan, J., and Belasco, J. G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 4034-4039.
- Xiao, F., Zuo, Z., Cai, G., Kang, S., Gao, X., and Li, T. (2009). miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res* *37*, D105-110.
- Xiong, Z., and Laird, P. W. (1997). COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* *25*, 2532-2534.
- Yan, B. C., and Hart, J. A. (2009). Recent developments in liver pathology. *Arch Pathol Lab Med* *133*, 1078-1086.
- Yan, D., Zhou, X., Chen, X., Hu, D. N., Dong, X. D., Wang, J., Lu, F., Tu, L., and Qu, J. (2009). MicroRNA-34a inhibits uveal melanoma cell proliferation and migration through downregulation of c-Met. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *50*, 1559-1565.

Ying, S. Y., and Lin, S. L. (2005). Intronic microRNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 326, 515-520.

Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., and Anderson, T. A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 302, 1-12.

Zhou, X., Ruan, J., Wang, G., and Zhang, W. (2007). Characterization and identification of microRNA core promoters in four model species. *PLoS Comput Biol* 3, e37.

Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Lehmann-Mühlenhoff für die exzellente Betreuung und produktive Leitung der vorliegenden DFG-geförderten Arbeit sowie für die Gelegenheit, meine Ergebnisse zu publizieren, herzlich bedanken.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Kreipe für die Möglichkeit der Durchführung meiner Forschungsarbeiten am Institut für Pathologie der medizinischen Hochschule Hannover danken.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. rer. nat. Küster für die Übernahme des Korreferats sowie Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jacobsen für die Bereitschaft, als Drittprüfer dieser Arbeit zu agieren.

Mein besonderer Dank gilt allen diagnostisch tätigen Mitarbeitern des Institutes für Pathologie, die an dieser Arbeit beteiligt gewesen sind sowie denen, die mir bei meiner Forschungstätigkeit behilflich waren, insbesondere Anna, Britta, Elisa, Ewa, Daniel, Danny, Jan, Jeanette, Henriette, Karin, Katharina, Kathleen, Lukman, Matthias, Michaela, Till und Wolfgang.

Selbstredend gilt mein Dank auch allen Studenten der Humanmedizin, die am Institut für Pathologie im Rahmen ihrer Doktorarbeit tätig waren, vor allem Dina, Elisa, Julia, Friedrich, Lavinia, Marlene und Monika.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Familie, die mir in meiner Zeit als Doktorand immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Ich danke von ganzem Herzen Alla, Alex, Carsten, Hannelore, Horst, Horst, Inge, Marina, Margret, Regina, Ruben, Vera und Wolfgang.

Und natürlich bedanke ich mich bei meinen Freunden, die mir stets ein offenes Ohr und schöne Stunden geschenkt haben. Danke an Basti, Bene, Benny, Chris, Dennis, Hardy, Ingmar, Lan, Lennart, Leo, Suse und Wibke. Ihr seid die Besten.

Schließlich danke ich aus tiefstem Herzen Laura, die nicht nur zu mir, sondern auch zu vielen schönen Dingen des Lebens "Ja" gesagt hat. Du bist meine beste Freundin und mein schönstes Geschenk. Ich liebe Dich.

Ich widme die hier vorliegende Dissertation meinem Freund Helge Maler (*1978 - †2009), der stets an den Erfolg meiner Arbeit geglaubt hat. Du wirst für immer um uns sein, denn Freundschaft währt ewig.

Lebenslauf

- Promotion** 03/2007 - 05/2010 Institut für Pathologie, Medizinische Hochschule Hannover, Abschluss Dr. rer. nat. (Note: sehr gut)
- Berufspraxis** 11/2005 - 02/2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter mit Möglichkeit zur Promotion am Institut für Pflanzengenetik, Abt. Pflanzenbiotechnologie der Leibniz Universität Hannover
- Studium** 10/1999 - 09/2005 Studiengang Diplom-Biologie, Leibniz Universität Hannover, Abschluss Diplom-Biologe (Note: sehr gut)
- Zivildienst** 08/1998 - 08/1999 Kreiskrankenhaus Hameln, Pflege- und Transportdienst
- Schule** 08/1991 - 07/1998 Viktoria-Luise Gymnasium, Hameln, Abschluss Abitur (Note: 2,1)

Publikationen

Lehmann, U., Albat, C. and Kreipe, H. (in press). High-resolution quantitative methylation analysis of microRNA genes using Pyrosequencing™. In *Methods in Molecular Biology: Metastasis Research Protocols*, second edition, S. Brooks, M. Dwek, U. Schumacher, eds. (Berlin, Germany, Springer Science+Business Media Deutschland GmbH).

Lehmann, U., Streichert, T., Otto, B., Albat, C., Hasemeier, B., Christgen, H., Schipper, E., Hille, U., Kreipe, H. H., and Langer, F. (2010). Identification of differentially expressed microRNAs in human male breast cancer. *BMC Cancer* 10, 109.

Poster:

Albat, C. und Lehmann, U. (2009). Evaluation unterschiedlicher Algorithmen zur Vorhersage von microRNA-Zielgenen am Beispiel der differentiell methylierten microRNA Hsa-mir-1-1. 93. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Freiburg 2009.

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe. Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Dipl.-Biol. Cord Albat