

Aus dem Bereich Humangenetik
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Nachweis amplifizierter MicroRNAs in Glioblastoma multiforme

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2010

vorgelegt von

Diana Sharif,

geboren am 27.07.1986 in Essen

Die experimentellen Arbeiten im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden am Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Tag der mündlichen Prüfung:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Michael D. Menger

Vorsitzender:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

für meine familie

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
3. Material und Methodik	12
3.1 Zelllinien und Gewebe	12
3.2 Isolierung von DNA	12
3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA nach der Methode der Fa. Qiagen®	12
3.3 Absorptionsmessungen	13
3.3.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	13
3.4 Agarosegelelektrophorese und DNA-Isolierung aus Agarosegelen	14
3.4.1 Agarose-Gelsystem für DNA	15
3.4.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	16
3.5 Isolierung von RNA	17
3.5.1 Isolierung von Total-RNA aus Zellkultur mit der Trizol®-Methode	18
3.5.2 Elektrophoretische Auftrennung von Total-RNA im Formaldehydgel	19
3.6 Isolierung von MicroRNA	21
3.6.1 Isolierung mittels Ambion flashPAGE™ Fractinator	21
3.6.2 Gelstar®-Platte zur Konzentrationsbestimmung	21
3.7 Polymerase-Kettenreaktion	22
3.7.1 PCR-Bedingungen	22
3.7.2 Global Amplification Kit®	24
3.8 Reverse Transkriptase Reaktion (RT-PCR)	27
3.8.1 RT-PCR-Bedingungen	27

3.9 Genexpressionsanalyse mit DNA-Microarray	29
3.9.1 Herstellung der markierten Sonden.....	30
3.9.2 Hybridisierung des Arrays	31
3.9.3 Waschen der Arrays	32
3.9.4 Auswerten der Arrays	33
3.10 Membranhybridisierung	34
3.10.1 Fixierung auf Nylonmembran	34
3.10.2 Hybridisierung der Membran	34
3.10.3 Reisolierung der gebundenen miRNAs.....	35
3.11 Klonierung mittels pGEMTeasy	36
3.11.1 Bakterienkulturen.....	37
3.11.2 Ligation	37
3.11.3 Transformation.....	37
4. Ergebnisse.....	39
4.1 Isolierung von miRNAs mittels flashPage™-System.....	39
4.2 Nachweis ausgewählter miRNAs	40
4.3 Hybridisierung der miRNAs gegen BAC-Array 12q13-21	49
4.4 Reisolierung der gebundenen miRNAs	54
5. Diskussion	59
5.1 Einfluss nachgewiesener miRNAs auf die Gliomgenese	60
5.2 Bedeutung des Nachweises amplifizierter miRNAs	62
5.3 Ausblicke	65

6. Literaturverzeichnis	67
7. Danksagung	73
8. Anhang	74

ABBILDUNGEN

Abbildung 3.1: Qualitätskontrolle von Gesamt-RNA durch Ethidiumbromid-Färbung	20
Abbildung 3.9: Plasmidkarte des Vektors pGEM-T- <i>Easy</i>	36
Abbildung 4.1: RNA-Gel zur Größenkontrolle der miRNA-Fraktionen des TX3868.....	39
Abbildung 4.2: Ethidiumbromid-Platte zur Konzentrationsbestimmung der miRNA-Fraktionen in den Zellen des TX3868 und dem Glioblastom H1300.....	40
Abbildung 4.3: PCR-Produkt der Umschreibung des TX3868 für die hsa-miR-616	41
Abbildung 4.4: Nachweis der hsa-miR-616	42
Abbildung 4.5: PCR-Produkt für die hsa-miR-26a-2 in TX3868.....	43
Abbildung 4.6: Bestätigung des Nachweises der hsa-miR-26a-2	44
Abbildung 4.7: PCR-Nachweis der hsa-miR-16-1	45
Abbildung 4.8: Bestätigung der hsa-miR-16-1 in TX3868.....	46
Abbildung 4.9: PCR-Nachweis der hsa-miR-16-1 in HeLa-Zellen	46
Abbildung 4.10: Bestätigung der hsa-miR-16-1 in HeLa-Zellen	47
Abbildung 4.11: Nachweis der hsa-miR-16-1 in den Zellen des TX3868 und dem Glioblastom H1300	48
Abbildung 4.12: Nachweise der hsa-miR-21 in TX3868	49
Abbildung 4.13: 12q13-21 Array-miRNA-Hybridisierung der Zellen des TX3868	51
Abbildung 4.14: 12q13-21 Array-miRNA-Hybridisierung der Zellen des TX3868 nach veränderten Hybridisierungsbedingungen.....	53
Abbildung 4.15: Membranhybridisierung der identifizierten BACs gegen Cy5-miRN-cDNA des TX3868.....	55
Abbildung 4.16: Reamplifikation der gebundenen miRNAs	56
Abbildung 4.17: Membranhybridisierung der identifizierten BACs gegen Cy5-miRNA-cDNA des TX3868 nach veränderten Hybridisierungsbedingungen	57
Abbildung 4.18: Membranhybridisierung der identifizierten BACs gegen Cy5-miRNA-cDNA des TX3868.....	57
Abbildung 4.19: Amplifikation der gebundenen miRNAs	58

TABELLEN

Tabelle 4.1: Ergebnisse der quantifizierten Array-miRNA-Hybridisierung	52
Tabelle 4.2: Ergebnisse der quantifizierten Array-miRNA-Hybridisierung	54
Tabelle A.1.1: Reihenfolge der aufgetragenen Spots der Array-miRNA-Hybridisierung des Chromosomenabschnitts 12q13-21.....	74
Tabelle A.1.2: Ergebnisse der quantifizierten Array-miRNA-Hybridisierungen gegen markierte miRNA-cDNA der Zellen des TX3868.....	75

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
abs	absolut
aqua dest.	aqua destillata
BAC	bacterial artificial chromosome
bds	beidseits
BFB	breakage-fusion-bridge
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	copy DNA
CDK	cyclin dependent kinase
CDKN2A/B	cyclin dependent kinase inhibitor-2A/B
CGH	Comparative Genomic Hybridization
cm	Zentimeter
Cy3	Cyanine 3
Cy5	Cyanine 5
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
deion.	deionisiert
DM	double minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOP	PCR degenerated oligonucleotid
DSB	Doppelstrangbruch-DNA
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
et al.	et alii (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
for	forward (vorwärts)
g	Erdbeschleunigung 9,81m/s ²
g	Gramm
GBM	Glioblastoma multiforme
Gy	Gray
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HeLa	humane Epithelzelllinie eines Zervixkarzinoms
HRE	hypoxia response element, Bindungsstelle für HIF-1
HSR	homogeneously staining region
Kb	Kilobasenpaar
ISH	In situ-Hybridisierung
l	Liter

LOH	loss of heterozygosity, Verlust der Heterozygotie
M	Molar
MDM2	murine double minute 2
MMR	mismatch repair
Min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol/l	Millimol pro liter
mol/l	Mol pro liter
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NaOH	Natriumhydroxid
Nr.	Nummer
OT	Objektträger
p	Bezeichnung für den kurzen Arm eines Chromosoms (petit)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGFR	platelet derived growth factor receptor
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat
PTEN	phosphatase and tensin homolog
q	Bezeichnung für den langen Arm eines Chromosoms (queue)
RB1	retinoblastoma 1
rev	reverse (rückwärts)
RNase	Ribonuklease
Rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
S	Standardabweichung
sec.	Sekunden
Ss	einzelsträngig
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SSPE	sodium chloride-sodium phosphate-EDTA-Puffer
ssssDNA	single stranded salmon sperm DNA
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TMZ	Temozolomid
TP53	Tumorsuppressorgen p53
Tris	Trishydroxymethylaminomethan-Puffer
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht
v.a.	vor allem
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vol.	Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

1. Zusammenfassung

Zentrales Ziel der von mir durchgeführten Untersuchungen war die Identifizierung von microRNAs (miRNAs) aus genomischen Bereichen, die in Glioblastomen häufig amplifiziert werden. Die ersten miRNAs *let-7* und *lin-4* wurden in dem Wurm *Caenorhabditis elegans* entdeckt. In den letzten Jahren wurde in zunehmendem Maße die Bedeutung von miRNAs für die Tumorgenese im Allgemeinen und die Biologie des Glioblastoms insbesondere thematisiert. Glioblastome stellen einen der bösartigsten Tumoren des zentralen Nervensystems mit infauster Prognose dar. Sie sind häufig durch spezifische genetische Veränderungen, insbesondere durch Amplifikationen, bei denen DNA-Bereiche in erhöhten Kopiezahl vorliegen, charakterisiert. Die vorliegende Arbeit ist thematisch im Schnittfeld von Genamplifikation und miRNA-Expression angesiedelt.

Ein Schwerpunkt der durchgeführten Arbeit war die Bestimmung der Expression bekannter miRNAs aus der Chromosomenregion 12q13-21, die durch häufige Genamplifikation bei Glioblastomen charakterisiert ist. Mit Hilfe von PCR-Amplifikationen konnte in einer von einem Glioblastom angelegten Zelllinie (TX3868) die Expression von drei miRNAs (*hsa-miR-16-1*, *hsa-miR-26a-2*, *hsa-miR-616*) nachgewiesen werden. Um bisher nicht bekannte miRNAs in dem amplifizierten Bereich auf 12q13-21 zu identifizieren, wurden miRNAs aus den Zellen des TX3868 angereichert, in cDNA umgeschrieben und anschließend gegen einen speziell konstruierten BAC (*bacterial artificial chromosome*)-Array hybridisiert, der die chromosomale Region 12q13-21 repräsentiert. Für einen der BAC-Klone wurde ein Hybridisierungssignal gefunden. Die darauffolgende Reisolierung der gebundenen cDNA zeigt das Vorhandensein einer miRNA, die in diesem Bereich lokalisiert sein könnte, an. Weitere Versuche müssen klären, inwieweit es sich hier um eine neue miRNA handelt und ob mit der Methode gegebenenfalls eine weitere miRNAs-Isolierung aus dem amplifizierten Bereich möglich ist.

Detection of amplified microRNAs in glioblastoma multiforme

1. Summary

The study aimed at identifying microRNAs (miRNAs) in genomic regions, which are frequently amplified in glioblastoma. The first identified miRNAs, *let-7* and *lin-4*, were found in the worm *Caenorhabditis elegans*. Recently, the importance of miRNAs in regards to the genesis of tumors in general and to the biology of the glioblastoma in particular was increasingly discussed. Glioblastoma are among the most malignant tumors to be found in the central nervous system and usually lead to the death of the patient. They often come along with specific genetic changes, in particular with amplifications of certain DNA regions. The present work deals with the relation of genetic amplification and miRNA-expression. A main focus of this study was the detection of the expression of known miRNAs from an amplified domain at 12q13-21 that has been frequently found in GBM. By means of PCR-amplification, it was possible to demonstrate the expression of three miRNAs (hsa-miR-16-1, hsa-miR-26a-2, hsa-miR-616) in a glioblastoma cell line (TX3868). To identify miRNAs that are currently still unknown in the genomically amplified region 12q13-21, miRNAs were enriched from TX3868 cells, transcribed into cDNA and then hybridized against a specially designed BAC (*bacterial artificial chromosome*)-array, representing the chromosomal region 12q13-21. These experiments evinced the existence of a hybridizing signal for one BAC-clone. The subsequent re-isolation of the bound cDNAs indicated the presence of a miRNA, which could be located in this region. Further experiments are necessary to confirm this miRNA as new miRNA and whether further miRNAs-isolation from the amplified region is possible using the method described in the current study.

2. Einleitung

Das Nervengewebe entsteht aus der ektodermalen Neuralplatte, deren Ränder sich zur Neuralrinne auswerfen und anschließend zum Neuralrohr verschmelzen. Aus ihnen gehen die Neuralleiste, die Nervenzellen sowie die Neuroglia hervor [57].

Nervenzellen, die das eigentliche Parenchym des Nervengewebes darstellen, werden von Gliazellen umgeben. Man unterteilt sie wie folgt:

- Astrogliazellen (Makroglia)
- Oligodendrogliazellen
- Mesoglia (Mikroglia)

Die Astrozyten fungieren als „Ionenmilieu-Kontrolleure“ und organisieren die schnelle Beseitigung freigesetzter Neurotransmitter. Den Oligodendrozyten kommt die Rolle der „Nervenfaser-Isolatoren“ zu. Die Mikroglia sind „Immun-Kontrolleure“ und wandern als Mitglieder des Makrophagensystems ins Hirngewebe ein [52].

Nach heutiger Kenntnis werden neoplastische Läsionen des zentralen Nervensystems (=ZNS) im intrakraniellen und intraspinalen Raum durch Mutationen im Genom der betroffenen Zellen ausgelöst [56]. Die meisten ZNS-Tumoren sind klinisch maligne.

Astrozytäre Tumore leiten sich von den Astrozyten ab und können im gesamten Gehirn vorkommen. Es sind die häufigsten Tumoren des ZNS. Eine in der klinischen Praxis häufig genutzte Einteilung ist die WHO (*world health organisation*)-Klassifikation der Hirntumoren: Je nach Malignität werden vier Grade unterschieden. Diese Grade geben über das „klinisch-biologische“ Verhalten Auskunft (Mitosezahl, destruierendes Wachstum, Nekrosen) und können somit eine Einschätzung des Wachstumsverhaltens und der Prognose erleichtern [37].

Grad I beinhaltet alle gutartigen Tumoren mit niedriger Proliferationsrate und der Möglichkeit der vollständigen Resektion durch einen chirurgischen Eingriff. In diese Kategorie fällt das pilozytische Astrozytom. Grad II beschreibt das diffuse Astrozytom mit zytologischen Atypien und einem langsamen, jedoch infiltrativen Wachstum. Zu Grad III gehört das anaplastische Astrozytom mit Anaplasie, mitotischen Aktivitäten und histologischem Beweis für Malignität. Grad IV wird dem zytologisch malignen, mitotisch aktiven und mikrovaskulär proliferierenden oder nekrotisierenden Glioblastom zugeschrieben [14].

Unter den verschiedenen Tumorarten bilden die von den ZNS-Stützzellen ausgehenden Gliome die größte Gruppe, gefolgt von den Tumoren der Hirnhäute. Während bei Kindern vor allem niedriggradige Gliome so wie embryonale Tumore dominieren, stehen bei den älteren Menschen hochgradige Gliome, Meningiome sowie Karzinometastasen im Vordergrund [61]. Nach wie vor ist die allgemeine Pathogenese der ZNS-Tumoren bei Menschen unklar. Eine kausale Bedeutung chemischer Kanzerogene oder viraler Infektionen ist beim Menschen nicht gesichert. Mehr als 90 % aller ZNS-Tumoren treten sporadisch auf. Nur bei wenigen Patienten gibt es Hinweise für eine erbliche Prädisposition, bei der es sich meistens um hereditäre Tumorsyndrome handelt, die in der Mehrzahl der Fälle durch Keimbahnmutationen in Tumorsuppressorgenen bedingt sind [52].

Das Glioblastom macht ca. 15 % aller Hirntumore und ca. 70 % der astrozytären Tumore aus. Die Inzidenz beträgt 3-4 Neuerkrankungen pro 100.000 Personen im Jahr [61]. Es ist oft fronto-temporal lokalisiert. Das Wachstum beginnt auf einer Seite und kann sich über den Balken zur anderen Hemisphäre ausbreiten (=Schmetterlingsgliom). Makroskopisch bietet sich ein buntes Bild mit Blutungen, Verkalkungen, Nekrosen, Verfettungen und einem perifokalen Ödem [4]. Auf dieser Beobachtung basierend, dass das Erscheinungsbild sehr variabel (multiform) sein kann, wurde die Bezeichnung *Glioblastoma multiforme* geprägt. Histopathologisch ist das Glioblastom gekennzeichnet durch nukleäre Atypien, einen erhöhten Mitoseindex und Gefäßproliferate [62, 49].

Die Klinik des Glioblastoma multiforme beschreibt nur einen kurzen Zeitraum, da sich wegen des raschen Wachstums die Beschwerden meistens innerhalb weniger Wochen bis Monate entwickeln. Symptome und Zeichen eines angestiegenen intrakraniellen Hirndrucks sind häufig, wie zum Beispiel Kopfschmerzen oder Übelkeit. Mehr als ein Drittel der betroffenen Patienten entwickeln im Laufe der Zeit einen epileptischen Anfall. Fokale neurologische Ausfälle wie Lähmungen, Aphasien und Sehstörungen können lokalisationsabhängig hinzukommen. Schließlich sind es oft auffällige Persönlichkeitsveränderungen, Apathie oder psychomotorische Verlangsamung, die in den Vordergrund der Erkrankung treten [26].

Die Diagnose wird anhand bildgebender Verfahren gestützt. In der CT (Computertomographie)-Bildgebung mit Kontrastmittel erscheint das Glioblastom unregelmäßig geformt mit randständig starker Kontrastmittelaufnahme (ringförmiges Enhancement) [32]. Im MRT (Magnetresonanztomographie)-Befund sind die soliden Anteile des Glioblastoms stark mit Kontrastmittel angereichert.

Bestätigt wird die Diagnose letzten Endes durch den neuropathologischen Befund anhand von Tumorgewebe, das meist mittels stereotaktischer Hirnbiopsie oder Tumorresektion gewonnen wurde. Tumormarker in Serum oder Liquor stehen nicht zur Verfügung.

Trotz der Fortschritte in der Therapie für Glioblastome in den Disziplinen der Chirurgie, Radio- und Chemotherapie, ist eine endgültige Heilung bislang nicht möglich [42]. Laut dem amerikanischen Hirntumorregister (<http://www.cbtrus.org/>) liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei nur 3 %, da es auf Grund der diffusen Infiltration des Hirngewebes durch Tumorzellen nach der Behandlung häufig innerhalb von Monaten zu einem Rezidiv kommen kann [60].

Ein Meilenstein in der Behandlung des Glioblastoms ist die kombinierte Therapie einer Bestrahlung mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid (Temodal[®]).

Die "European Organization for Research and Treatment of Cancer" (EORTC) belegte zusammen mit dem "National Cancer Institute of Canada" (NCIC) in einer randomisierten prospektiven Studie, dass eine Radiotherapie mit begleitender sowie erhaltender Behandlung mit Temozolomid das Überleben der Patienten verlängert [48, 78]. In diese Studie wurden 573 Patienten mit neu diagnostiziertem, histologisch gesichertem Glioblastom eingeschlossen. Zum Zeitpunkt der Randomisierung lagen Biopsie oder Resektion weniger als 6 Wochen zurück. Die Studie sah zwei Behandlungsarme vor: Die Patienten wurden nach Zufall einer alleinigen Strahlentherapie zugeführt oder begleitend zur Bestrahlung und im Anschluss adjuvant mit Temozolomid behandelt. Als primärer Endpunkt der Studie wurde das Gesamtüberleben gewählt. In der Gruppe mit Radiochemotherapie betrug das mediane rezidivfreie Intervall 6,9 anstelle von 5 Monaten. Das mediane Überleben stieg von 12,1 auf 14,6 Monate. Besonders hervorzuheben ist die Steigerung der 2-Jahres-Überlebensrate durch die zusätzliche Therapie mit Temozolomid von 10 % auf 26 %. Das Behandlungsschema aus der EORTC-Studie 26981 stellt heute den Standard in der Primärtherapie des Glioblastoms dar.

Während das primäre Glioblastom sehr wahrscheinlich spontan entsteht, entwickelt sich das sekundäre Glioblastom im Laufe weniger Jahre aus einem Astrozytom mit geringerer Malignität [36]. Die unterschiedlichen Tumore sind durch distinkte Mutationen gekennzeichnet:

LOH 10q (*loss of heterozygosity on chromosom 10 and 17q*) ist in beiden histologischen Glioblastomtypen vorhanden [27]. EGFR (*epidermal growth factor receptor*)-Amplifikationen und PTEN (*phosphatase and tensin homolog*)-Mutationen sind v.a. genetische Alterationen im primären *de novo* Glioblastom [85, 55]. TP53 (*tumor protein 53*)-Mutationen sind frühe und häufige genetische Veränderungen in der Pathogenese des sekundären Glioblastoms [7, 81].

In den letzten Jahren werden zunehmend epigenetische Modifikationen und Einflüsse anderer Moleküle wie z.B. der an der Genregulation beteiligten MicroRNAs für die Gliombiologie diskutiert [15].

MicroRNAs (miRNA) sind endogene, kurze (19-24 Nukleotide), nicht protein-kodierende RNAs, welche die Genexpression auf dem Level der Posttranskription beeinflussen [65]. Der Grundstein der miRNAs wurde durch die Entdeckung der *lin-4*- und *let-7*-Gene in *Caenorhabditis elegans* gelegt. Das Produkt dieser beiden Gene ist eine 22 Nukleotid lange *small temporal (st)* RNA. Während die *let-7*-RNA die Spätlarvenphase bis zum Adulten entscheidend beeinflusst, reguliert die *lin-4*-RNA die Entwicklung vom ersten bis zum zweiten Larvenstadium [3]. Im Laufe der Zeit wurde von der Entdeckung von mehr als 100 verschiedenen endogenen 22 Nukleotiden langen RNAs in verschiedenen Spezies berichtet. Sie waren alle durch die Evolution konserviert, manche allgemein und andere in verwandten Spezies [84]. Viele dieser neu identifizierten RNAs zeigen im Gegensatz zur stadienspezifischen Expression der z.B. *lin-4* und *let-7*-RNA, eine zelltypspezifische Expression. Auf Grund dessen wurde der Terminus microRNA eingeführt, um auf die stRNAs und alle anderen kleinen RNAs hinzuweisen, die die gleichen Merkmale besitzen, jedoch mit noch unbekannter Funktion ausgestattet sind [56]. MiRNAs regulieren ihre Gentargets durch die imperfekte komplementäre Basenpaarung an der 3'-untranslatierten Region (=UTR) ihrer Target-mRNA. Dieser Vorgang hat entweder eine translationale Repression und/oder eine mRNA-Degradation zur Folge. Man geht davon aus, dass jede miRNA potenziell mehrere hundert verschiedene Ziele hat und jede mRNA durch eine oder mehrere miRNAs moduliert werden kann [33]. Zurzeit sind 922 humane miRNAs in der miRBase Version 14 registriert und man schätzt, dass beim Menschen 30 % der protein-kodierenden Gene durch miRNAs reguliert werden [46]. Die Gene für miRNAs liegen in Introns protein-kodierender Gene bzw. in Introns oder Exons nicht protein-kodierender Gene und nicht, wie anfangs angenommen, überwiegend zwischen Genregionen [68]. Humane miRNAs sind auf allen Chromosomen außer dem Y-Chromosom zu finden [41].

Das miRNA-Nomenklatur-Schema setzt sich auf folgenden Komponenten zusammen:

Der miRNA-Name enthält einen, drei oder vier Buchstaben langen Spezies-Präfix und einen individuellen Nummer-Suffix (zum Beispiel hsa (=homo sapiens)-miR-212), der einem Genlokus zugeordnet ist [30]. Zusätzliche Buchstaben-Suffixe stehen für geringfügige Unterschieden in den Sequenzen der miRNAs [65].

Wegen ihrer fundamentalen Bedeutung in der Regulation der Genexpression ist es nicht verwunderlich, dass miRNAs eine entscheidende Rolle bei der Initiation und Progression von menschlichen Tumoren spielen. Die miRNA-Expressionsmuster haben ihre Bedeutung in den verschiedensten Tumorarten, da sie das Verhalten der Tumorzellen modulieren [80].

Einige miRNAs verhalten sich wie Onkogene, indem sie sich in den transformierten Phänotyp umwandeln, wenn sie in Tumorzellen überexprimiert werden. Diese „Onkomirs“ funktionieren wahrscheinlich durch Suppression der Tumorsuppressorgene. Andere miRNAs wiederum können selbst als Tumorsuppressor auftreten. Sie sind schwach und gar nicht in Tumorzellen anwesend und wirken, indem sie die Expression von Onkogenen ermöglichen [44]. Durch Regulation der Translation von Onkogenen und Tumorsuppressoren sind miRNAs am Prozess der molekularen Tumorphathologie beteiligt. Sie sind ebenfalls in Tumor-assoziierten genomischen Regionen oder *fragile sites* lokalisiert [59].

Wie in anderen Tumorarten ist auch bei Glioblastomen ein charakteristisches miRNA-Expressionsmuster zu erkennen [43]. Durch unabhängige Studien konnten 17 hochregulierte und 33 herunterregulierte miRNAs identifiziert werden [65]. Einige deregulierte miRNAs werden im Folgenden näher in ihrer Funktion und Zielen in der Gliomgenese charakterisiert und diskutiert.

Die hsa-miR-21 konnte als eine der ersten hochregulierten miRNAs in Glioblastomen identifiziert werden. In kultivierten Glioblastomzellen führte ein Knockdown der hsa-miR-21 zu einer Aktivierung von Caspasen, die für den Anstieg der Apoptoserate verantwortlich sind [18]. Dies lässt auf eine anti-apoptotische Funktion der hsa-miR-21 schließen. Des Weiteren konnte sie mit verschiedenen Aspekten der Karzinogenese, Zellproliferation, Invasion und Migration in Verbindung gebracht werden [59]. Eine Überexpression dieser miRNAs wurde auch in anderen histologischen Krebsarten, wie zum Beispiel Brust-, Lunge-, Kolon-, Prostata-, Pankreas- und Magenkrebs nachgewiesen [80]. Der p53-, TGF- β - und mitochondriale apoptotische-Signalweg sind Targets der hsa-miR-21 [66]. Die direkten Zielproteine sind p63 (ein Homolog zu p53)- und p53-Aktivatoren (JMY, TOPORS, TP53BP2 und HNRNPK) [66]. Diese Proteine sind wichtig für die Funktion des Tumorsuppressors p53 [66]. Durch einen Angriff auf die Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen (*MMPs*), trägt die hsa-miR-21 zum invasiven Wachstum von Gliomzellen bei. *MMPs* sind eine Gruppe von Peptidasen, die in der Degradation der extrazellulären Matrix involviert sind [59]. Sie sind vor allem in humanen Gliomen überexprimiert und korrelieren mit der Tendenz zum malignen Wachstum [59, 71]. Als Target der hsa-miR-21 zählt ebenfalls der Tumorsuppressor PDCD4 (*programmed cell death 4*), welcher die Translation durch die Interaktion mit verschiedenen Faktoren inhibiert [59]. Zusammengefasst kann die hsa-miR-21 eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von Glioblastomen und anderen Krebsarten spielen.

Conti et al. identifizierten mit der hsa-miR-221 eine ebenfalls hochregulierte miRNA. Diese wird als eine miRNA mit onkogenem Potenzial beschrieben, die nur in high-grade Astrozytomen (III und IV) überexprimiert wird [18].

Ihre Funktion wurde zusammen mit der hsa-miR-222 untersucht, weil ihr Expressionsmuster in Beziehung zu einander steht und sie die gleiche Zielspezifität haben [59, 18]. Beide unterdrücken die Expression des zellzykluskontrollierenden Regulatorproteins p27^{Kip1} [28]. Das Expressionsprodukt des p27^{Kip1}-Gens ist ein Mitglied der Cip/Kip Familie der Cyclin-abhängigen Kinase (*cdk*)-Inhibitoren, welches eine Rolle als negativ Regulator in der Zellzyklusprogression einnimmt [28]. Es ist ein bekannter Tumorsuppressor, welcher in vielen Tumoren herunterreguliert ist und dessen niedrigeres Expressionslevel mit einer reduzierten Patientenüberlebensrate korreliert. Das Protein bindet an einen CDK2- und Cyclin-E-Komplex, um den Zellzyklus in der G₁-Phase zu arretieren [18]. Analysen der 3'-UTR von p27^{Kip1} lassen darauf schließen, dass die Repression dieses Proteins aus der direkten Bindung der hsa-miR-221 und hsa-miR-222 an der 3'-UTR resultiert [18]. CDK4 (*cyclin dependent kinase 4*) kann als möglicher Aktivator der hsa-miR-221 fungieren. Das Protein dieses Gens gehört zu Familie der Cyclin-abhängigen Kinasen und stellt eine katalytische Untereinheit des Proteins-Kinase-Komplex da, der für die Zellzyklus-Progression in der G₁-Phase wichtig ist [47]. Die Aktivität von CDK4 wird durch den Tumorsuppressor p16^{Ink4} inhibiert, welcher in Glioblastomen deletiert ist. Diese Deletion führt zu einer Hochregulation der hsa-miR-221. Eine Inhibition von CDK4 erhöht die Translation von p27^{Kip1}. Die vermehrte Expression der hsa-miR-221 liefert einen Hinweis auf eine spezifische Rolle dieser miRNA bei der defekten Zellzykluskontrolle und eine Erklärung für die hohe Proliferationsrate in Glioblastomen [59].

Die miRNAs der hsa-miR-181-Familie, hsa-miR-181a, -b und -c sind generell in humanen Gliomen und Gliomzelllinien unterexprimiert [17]. Sie sind auf drei verschiedenen Chromosomen (hsa-miR-181a auf 9q33.1-q34.13, die hsa-miR-181b auf 1q31.2-q32.1 und die hsa-miR-181c auf 19p13.3) lokalisiert. Die hsa-miR-181a und -181b inhibieren die Proliferation und Invasion, fördern jedoch die Apoptose von Gliomzellen *in vitro* [59]. Trotz der Deregulation dieser miRNAs in Glioblastomen und den beobachteten biologischen Effekten in den Zelllinien, konnten direkte Angriffsziele der hsa-miR-181a und -181b bis jetzt noch nicht identifiziert werden [59].

Ein weiterer potenzieller Tumorsuppressor in Glioblastomen ist die hsa-miR-7. Diese miRNA beeinflusst einen kritischen Signalweg, der eine wichtige Rolle bei der Kanzerogenese spielt [34]. Kefas et al. identifizierten die hsa-miR-7 in Glioblastomen als herunterregulierte miRNA und konnten in ihrer Arbeit nachweisen, dass sie einen regulierenden Einfluss auf die EGFR-Expression und den AKT-Signalweg hat [34]. Der EGFR/AKT-Signalweg hat einen entscheidenden Anteil an der Entstehung von primären Glioblastomen [59]. EGFR zum Beispiel ist in über 60 % der primären Glioblastomen überexprimiert, von denen allerdings nicht alle eine EGFR-Genamplifikation zeigen [59].

Die hsa-miR-7 inhibiert die EGFR-Expression direkt durch komplementäre Bindung an die 3'-UTR des EGFRs und den AKT-Signalweg indirekt durch ein EFGR-Signal [34].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Transfektion von Glioblastomzellen mit der hsa-miR-7 deren Überleben verkürzt und somit dessen Malignität reduziert [59]. Letzten Endes ist die Tendenz zum malignen Wachstum von Glioblastomen, die mit der EFGR- und AKT-Aktivität assoziiert sein kann, ein zentrales Charakteristikum für die Letalität der Patienten [34]. Beide Signalwege können durch die hsa-miR-7 beeinflusst werden.

Zu den gehirn-spezifischen miRNAs gehört die hsa-miR-128, die in Glioblastomen herunterreguliert ist [17]. Ihr direktes Ziel ist der Transkriptionsfaktor E2F3a, welcher Gene aktiviert, die für die Progression des Zellzyklus notwendig sind. Durch die negative Regulation von E2F3a kann die hsa-miR-128 die Proliferation von Gehirnzellen inhibieren [59]. Ein anderes direktes Ziel der hsa-miR-128 ist das onkogene Bmi-1, welches die Tumorsuppressoren p53 und p16^{Ink4a} reguliert [84]. Da Bmi-1 ein neuronaler selbsterneuernder Stammzellefaktor ist, kann die hsa-miR-128 durch ihre Wirkung auf das Bmi-1 auch die Hirnentwicklung beeinflussen [59].

Die Expressionslevel der hsa-miR-124 und der hsa-miR-137 sind in Glioblastomen und anaplastischen Astrozytomen vermindert [76]. Weiterhin konnten Silber et al. feststellen, dass diese miRNAs einen Zellzyklusarrest in der G₀/G₁-Phase in Glioblastomzelllinien fördern und eine neuronale Differenzierung von Glioblastom-Stammzellen in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren induzieren [76]. Beide miRNAs haben die Cyclin-abhängigen Kinase 6 (*cdk6*) zum Ziel, welche die Zellzyklusprogression und Differenzierung reguliert [59]. Über die Relevanz des AKT-Signalwegs und seinem negativem Regulator PTEN in der Pathogenese des Glioblastoms ist bereits ausreichend hingewiesen worden. Mutationen oder Deletionen von PTEN korrelieren mit einer schlechteren Prognose in multiplen Gliomsubtypen [31]. Huse et al. konnten in ihrer Studie die hsa-miR-26a als einen negativem Regulator von PTEN identifizieren und ihre Überexpression in humanen Gliomen dokumentieren [31]. Dabei zeigte sich, dass die Überexpression in den meisten Fällen Folge einer Genamplifikation in der chromosomalen Region 12q13.3-14.4 ist. Somit konnte die erste miRNA-Spezies beschrieben werden, welche durch ihre Überexpression den Prozess der malignen Transformation von Gliomen *in vivo* beschleunigen könnte [31].

Eine Reihe molekulargenetischer Veränderungen liegen der Entstehung von Tumoren zu Grunde. Die natürliche Auslese begünstigt Zellen, die Mutationen tragen, welche die Zellproliferation und das Überleben der Zellen steigern, ungeachtet der Wirkung auf die Nachbarzellen. In Tumorzellen treten überexprimierte Gene häufig auch als amplifizierte Gene auf, wie auch die hsa-miR-26a in high-grade Gliomen [31].

Diese genetischen Veränderungen der Zellen haben Einfluss auf die exakte Replikation des Genoms und verringern die Wirksamkeit der DNA-Reparatur. Dadurch wird das Auftreten von Chromosomenbrüchen und Neuordnungen erhöht, was abnormale und instabile Karyotypen zur Folge hat. An der Tumorentstehung sind vor allem Gene beteiligt, die eine wichtige Rolle in den Signalwegen der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und des Zelltodes spielen [82]: Tumorsuppressorgene, Stabilitätsgene und Onkogene.

Eine Amplifikation von Onkogenen kommt in Tumoren häufig vor und ist oft zytogenetisch in den Zellen als zusätzliches Paar von Mini-Chromosomen, *double minutes* (DM) oder einer homogen anfärbbaren Region, *homogeneously staining region* (HSR), die das normale Bandenmuster eines der regulären Chromosomen unterbricht, erkennbar [23].

Bei HSRs handelt es sich um stabile Amplifikationsereignisse, bei denen die zusätzlichen Genkopien innerhalb der Chromosomen bleiben, aber häufig von ihrem Ursprungsort entfernt integriert sind [75]. DMs sind instabile Genamplifikationen, bei denen die zusätzlichen Genkopien extrachromosomal vorliegen. Diese beiden DNA-Strukturen sind Marker für die Amplifikationen in Tumorzellen [69].

Ein heute als klassisch postulierter Mechanismus der Genamplifikation wird als *breakage-fusion-bridge cycle* (BFB-Zyklus) bezeichnet, der in einer Zelle agiert, wenn es zu einem DNA-Doppelstrangbruch (DSB) oder einer Fusion von Schwesterchromatiden mit verkürzten Telomeren kommt [40]. Der BFB-Zyklus ist gekennzeichnet durch sich wiederholende Zyklen von Chromosomenbrüchen, Fusionen von Schwesterchromatiden und der Bildung von Anaphasenbrücken [19]. Es kommt zu einer Akkumulation von Genkopien, die als *inverted repeats* (invertierte Wiederholungen) angeordnet sind.

Die Amplifizierung von chromosomalen Regionen lässt sich durch eine vergleichende Hybridisierung von Genomen (*comperative genomic hybridization*, CGH) untersuchen.

Glioblastome sind durch genomische Instabilität und häufige Amplifikationen charakterisiert, die sich mehr als *double minutes* Chromosomen im Gegensatz zu den *homogeneously staining* Regionen manifestieren [25].

Häufige Amplifikationen sind in den sogenannten Amplifikationseinheiten, den Regionen 7p13 und 12q13-15, zu finden [24, 72, 73]. Auf Abschnitt 7p11-p12 ist, neben 79 weiteren Genen, das Gen für den *epidermal growth factor receptor* lokalisiert. Das EGFR-Gen wird mit 48,75 % aller Glioblastome am häufigsten amplifiziert und trägt zum großen Teil zur malignen Transformation, damit zu einer sehr schlechten Prognose, bei. In der zweiten Amplifikationseinheit 12q13-15 konnten Amplifikationen bzw. Überexpressionen von Onkogenen nachgewiesen werden. In der Region 12q13.3-14.1 ist eine Amplifikation von 34 Genen bekannt, unter denen sich auch das CDK4-Gen befindet. In 20,52 % der Glioblastome ist eine Amplifikation und Überexpression für eines oder mehrerer Gene diese

Amplikons beschrieben. Für das MDM2-Gen (*murine double minute 2*), welches an der Regulation von TP53 beteiligt ist, liegt neben weiteren 44 Genen dieser Region, in 11,25 % der Glioblastome eine Amplifikation vor [58].

Durch Untersuchungen von zwei Glioblastomen (T3564 und TX3868) und einem anaplastischen Astrozytom (G1284) konnte die Amplifikation von 12 Genen der Amplifikationseinheit 12q13-15 sowie deren Überexpression nachgewiesen werden.

Die von einem Glioblastom abstammende Zelllinie TX3868 wurde in dieser Doktorarbeit für weitere Untersuchungen verwendet [24].

In einer umfangreichen Analyse der Amplifikation der Chromosomenregion 12q13-21 in menschlichen Gliomen konnten mit Hilfe von BAC-Array Untersuchungen verschiedene Subregionen identifiziert werden, die häufig in Gliomen amplifiziert sind [25].

Einige dieser Subregionen enthalten keine bekannten Gene und die Bedeutung der Amplifikation solcher Bereiche ist ungeklärt. Interessanterweise sind solche „Gen-leeren“ amplifizierten Regionen über mehrere Jahre in einem Glioblastompatienten unverändert erhalten geblieben. Da man einen gewissen Selektionsdruck für den Erhalt eines Amplikons annehmen kann, ist eine genaue Untersuchung der Bedeutung solcher „Gen-leeren“ amplifizierten Chromosomenregionen besonders interessant.

Ziel der Arbeit ist es zu klären, ob miRNAs in den genomisch amplifizierten Bereich der Chromosomenregion 12q13-21 vorkommen, in der keine bekannten Gene lokalisiert sind und eine Methode zu optimieren, diese Bereiche genauer zu analysieren. Das Vorhandensein von miRNAs in diesem amplifizierten „Gen-leeren“ Regionen könnte erklären, warum diese Regionen über lange Zeit in vivo in Glioblastomen amplifiziert bleiben. Damit ergäben sich wichtige Erkenntnisse zu genunabhängigen Selektionsmechanismen von amplifizierten Regionen.

3. Material und Methodik

3.1 Zelllinien und Gewebe

Es wurden die Zelllinien des TX3868 und der HeLa (Zervixkarzinom)-Zellen untersucht. Des Weiteren wurden Glioblastomgewebsproben des Glioblastom H1300 und menschliche Leukozytenzellen verwendet.

3.2 Isolierung von DNA

3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA nach der Methode der Fa. Qiagen®

Diese Methode ist geeignet, um größere Mengen reiner Plasmid-DNA zum Einsatz in einer Sequenzierungs-PCR oder anderen empfindlichen Anwendungen zu erhalten. Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen® durchgeführt. Das aufzuarbeitende Bakteriensediment wurde hergestellt, indem 5 ml LB-Medium (versetzt mit 0,05 % Ampicilin) mit *E.coli* (aus einer Glycerin-Stammkultur bzw. von einer Selektionsplatte) angeimpft und über Nacht bei 37°C bei 100 rpm inkubiert wurden. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 14000 g für 1 min geerntet und die Plasmid-DNA entsprechend der Vorschrift des Herstellers gereinigt. Der Bakteriensaufschluss erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Durch die Bindung der dabei freigesetzten Plasmid-DNA an das Säulenmaterial wurde eine Abtrennung der rekombinanten Plasmide von der chromosomalen Bakterien-DNA erreicht. Die Lagerung für kurze Dauer erfolgte bei 4°C und für einen längeren Zeitraum in Glycerolstocks (dh. + 500 µl Glycerin) bei -20°C.

3.3 Absorptionsmessungen

Absorptionsmessungen werden zur schnellen Konzentrationsbestimmung von Proteinen oder Nucleinsäuren benutzt. In vielen Fällen kann auch die Reinheit der isolierten Makromoleküle anhand des Absorptionsspektrums abgeschätzt werden. Absorptionsvorgänge im sichtbaren Bereich oder im UV-Bereich beruhen auf elektronischen Übergängen im Makromolekül.

Durch die Absorption der elektromagnetischen Strahlung nimmt die Intensität eines Lichtstrahls beim Durchlaufen einer transparenten Substanz ab. Das Ausmaß der Absorption wird als Extinktion (E) bezeichnet. Die Extinktion ist proportional der Konzentration c der absorbierenden Substanz und der durchlaufenden Schichtdicke d. Durch die Einführung eines Proportionalitätsfaktor ϵ , den man als Molaren Extinktionskoeffizienten bezeichnet, wird daraus eine Gleichung, das Lambert-Beersche-Gesetz:

$$E = \epsilon \times c \times d.$$

Berücksichtigt man, dass die Intensität des eingestrahnten Lichtes I_0 einer gegebenen Wellenlänge exponentiell längs des Weges abnimmt, gilt auch:

$$\log I_0/I = E = \epsilon \times c \times d$$

I_0 = Intensität des eingestrahnten Lichts

I = Intensität des gemessenen Lichts

E = Extinktion

ϵ = Molarer Extinktionskoeffizient [$\text{cm}^2 \times \mu\text{mol}^{-1}$]

d = Länge der Messstrecke (Küvette) [cm]

c = Konzentration der absorbierenden Moleküle [$\text{mol} \times \text{l}^{-1}$]

3.3.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Konzentration von Nucleinsäuren wird durch photometrische Bestimmung der Absorption einer Lösung bei 260 nm und 280 nm gemessen. Nucleinsäuren haben aufgrund der Spektraleigenschaften der Basen ein Absorptionsmaximum im ultravioletten Licht bei 260 nm. Bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht eine optische Dichte (OD) von 1 einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA und 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Für einzelsträngige DNA entspricht dieser Wert 37 $\mu\text{g/ml}$, für kurzkettige Oligonukleotide dagegen 20 $\mu\text{g/ml}$. Einzelsträngige DNA absorbiert das Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm 1,4 mal mehr als doppelsträngige DNA (Hyperchromizitätseffekt).

Die Konzentration berechnet sich wie folgt:

DNAkonz. = $50 \times$ gemessene Absorption \times Verdünnungsfaktor ($\mu\text{g/ml}$)

RNAkonz. = $40 \times$ gemessene Absorption \times Verdünnungsfaktor ($\mu\text{g/ml}$)

Mittels UV-Spektroskopie wurde die Reinheit und Konzentration an isolierter RNA/DNA bei 260 bzw. 280 nm gegen 80 μl TE (pH 7,5) gemessen und ermittelt.

Aus dem Verhältnis E_{260} zu E_{280} errechnet sich der Reinheitskoeffizient, welcher Auskunft über eine eventuelle Verunreinigung der RNA durch Proteine gibt. Bei sauberen DNA-Lösungen liegt dieser Quotient zwischen 1,8 und 1,95. Saubere RNA-Präparationen haben ein Verhältnis, das zwischen 1,7 und 2 liegt. Ist der Koeffizient kleiner, ist die Präparation kontaminiert und die RNA/DNA sollte in diesem Falle erneut gereinigt werden.

Die Messungen wurden mit dem Eppendorf Biophotometer durchgeführt.

3.4 Agarosegelelektrophorese und DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Für die Elektrophorese von Nukleinsäuren werden Agarose- und Polyacrylamid-Gelsysteme unter nativen wie auch denaturierenden Bedingungen verwendet. Beide Gelarten eignen sich sowohl zur Analyse als auch zur präparativen Isolierung von Nukleinsäuren.

Grundsätzliche Unterschiede zwischen den Elektrophoreseverfahren für DNA und RNA bestehen nicht. Unter den elektrophoretischen Bedingungen sind die Phosphatgruppen im Rückgrat der Nukleinsäuren ionisiert und die Poly(desoxy)nukleotide liegen als Polyanion vor. Sie bewegen sich somit im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Ihre Beweglichkeiten hängen weitgehend von der Molekulargröße bzw. -länge ab. Zur Größenbestimmung und zur Zuordnung von Nukleinsäurefragmenten müssen bei der elektrophoretischen Trennung stets Größenstandards mit aufgetrennt werden.

3.4.1 Agarose-Gelsysteme für DNA

50 x TAE	2 M Tris (242,2 g) 1 M Essigsäure (57,1 ml) 50 mM EDTA (14,62 g) ad 1 l H ₂ O _{dd} pH 8,0
10 x Ladepuffer	1 x TAE 70 % (v/v) Glycerin (3,5 ml) 0,5 M EDTA (0,04 ml) Bromphenolblau wenige Kristalle Xylencyanol wenige Kristalle ad 5 ml H ₂ O _{dd}
GelStar®-Lösung	10 µl GelStar® nucleic acid gel stain (10000 x konzentriert, in DMSO gelöst) 100 ml 1 x TAE (Cambrex Bio Science Rockland, Inc.)
Agarose	1,0 g NuSieve 0,5 g Agarose

Die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld wird zur Trennung komplexer Gemische von Biomolekülen genutzt. Unter dem Begriff Elektrophorese werden diese Trennmethode zusammengefasst. Während Polyacrylamidgele als Trägermaterial für die Gelelektrophorese das höchste Auflösungsvermögen besitzen, trennen Agarosegele über einen weit größeren Längenbereich auf. Agarose-Gelsysteme sind die Standardmethode für die Trennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten oder RNA-Proben. Agarose ist ein Polysaccharid und wird aus roten Meeresalgen hergestellt. Durch Aufkochen in Wasser wird die Agarose gelöst und beim Abkühlen geliert. Dabei bilden sich Doppelhelices aus, die sich in Gruppen parallel zu Fäden zusammenlagern, dadurch erhält die großporige Gelmatrix ihre Festigkeit. Durch Aufgießen der aufgekochten Agaroselösung auf eine entsprechende Flachbettapparatur werden die Gele erzeugt. DNA-Fragmente können der Größe nach aufgetrennt und anschließend mit einem interkalierenden Farbstoff wie z.B. GelStar® angefärbt, sichtbar werden.

Die verwendeten Agarosegele besaßen eine Agarosekonzentration von 3 %, um die gewünschte Trennleistung bei den zu erwarteten kleinen Fragmenten zwischen 50 bp und 1 kb zu erreichen. Vor dem Beladen der Geltaschen mit den DNA-Proben wurden diese mit

1 µl 10 x Probenpuffer versetzt. Zur Auftrennung wurde eine horizontale Elektrophoresekammer mit 1 x TAE-Laufpuffer benutzt und erfolgte bei 120 V für 1-2 h. Ein Längenstandard (siehe Anhang A.5) wurde mit aufgetragen, um die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente abschätzen zu können. Nach der Gelelektrophorese wurden die Agarosegele für 1 h in einer GelStar[®]-Lösung gefärbt und die DNA unter Blaulicht sichtbar gemacht. Die Dokumentation der Agarosegele erfolgte mittels einer Fotoanlage der Firma Biometra.

3.4.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

6 x Volumen QG Puffer
1 x Volumen Isopropanol
750 ml PE Puffer
100 µl EB Puffer

Die Gelextraktion wurde zur Trennung "gewünschter" von "ungewünschter" DNA verwendet. Hierfür wurde die cDNA in einem 3 % Agarosegel aufgetrennt. Als Molekulargewichtsmarker wurde der „DNA Low Ladder“ (New England Biolabs) verwendet. Er diente als Laufkontrolle der Fragmente und damit der Markierung der auszuschneidenden Fragmente, welche sich zwischen 100 und 50 Basenpaaren befanden. Das entspricht der Größe der gesuchten miRNAs plus den entsprechenden Primern. Die Lage der DNA-Banden wurde anhand des Molekulargewichtsmarkers bestimmt und unter UV-Licht mit einem Schnitt markiert. Es wurde das UV-Licht ausgeschaltet und durch die Schnittmarkierungen die entsprechenden Banden mit ausgeschnitten. Nach Entfernung der Extraagarose wurde das Fragment in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, welche zuvor ausgewogen wurden. Durch eine Wägung der Eppendorf-Reaktionsgefäße mit den Gelstücken wurde die Masse der Gelstücke bestimmt und zur weiteren Aufreinigung das QIAquick[®] Gel Extraction Kit-Spin Protokoll verwendet. Pro 100 mg Gel wurden 300 µl QG-Puffer und für Gele mit über 2 % Agaroseanteil wurde das sechsfache Volumen des Puffers hinzugegeben. Die Proben wurden für 15 min bei 50°C inkubiert, bis die Gelblöcke vollständig verflüssigt waren. Durch regelmäßiges Vortexen alle 2-3 min wurde die Auflösung der Gelblöcke erreicht. Der Ansatz sollte zu diesem Zeitpunkt gelb gefärbt sein, denn der QG-Puffer enthält einen pH-Indikator. Falls die Lösung einen orangefarbenen oder violetten Farbton aufweist, sind 10 µl 3 M Natriumacetat (NaOAc), pH 5,0 zuzugeben, um den für die Bindung der DNA an die Säulen optimalen pH-Wert von ca. 7,5 zu erreichen. Anschließend wurde den Proben das einfache Gelvolumen Isopropanol hinzugegeben, was die Ausbeute der DNA-Fragmente

unter 500 Basen und über vier Kilobasen erhöht. Der Ansatz wurde über eine kommerziell erhältliche Anionenaustauscher-Säule (spin column) gegeben und für 1 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nun folgten die Waschschriffe: Der Auftragspuffer wurde verworfen, 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben und erneut für 1 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Um noch die letzten Reste von PE-Puffer zu entfernen, wurde die Säule wieder unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die gereinigte DNA von der Säule durch Eluation gelöst. Die Säule wurde auf ein neues, steriles Eppendorfgefäß gesetzt und 100 µl EB-Puffer in die Mitte der Säule pipettiert. Nun wurde nochmals für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf enthält die gereinigte Fragment-DNA und wurde durch Zusatz des 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 7,0) und des dreifachen Volumens 100 % Ethanol (eiskalt) bei -20°C über Nacht gefällt. Durch Zentrifugation wurde das Präzipitat am nächsten Tag gesammelt. Mit Hilfe einer PCR-Amplifikation und erneuter Auftragung auf ein Gel konnte verifiziert werden, ob die richtigen Fragmentgrößen aufgereinigt wurden.

3.5 Isolierung von RNA

RNA ist im Vergleich zu DNA sehr anfällig für spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse. RNasen kommen ubiquitär vor, sind sehr stabil und können nach Denaturierung wie zum Beispiel durch Sieden oder Autoklavieren schnell wieder renaturieren. Demzufolge sind besondere Vorkehrungen beim Arbeiten mit RNA zu treffen.

Zunächst sollten RNA-Proben immer auf Eis gehandhabt werden, da die Enzymaktivität bei 0-4°C deutlich niedriger ist als bei Raumtemperatur. Anschließend sollte jederzeit darauf geachtet werden das beim Ansetzen von Lösungen Handschuhe getragen werden, da Hände eine wesentliche Quelle für RNase-Kontaminationen sind. Zum Arbeiten mit RNA wurde ein gesonderter Satz an Geräten und Chemikalien verwendet. Die hitzestabilen Glas- und Metallgeräte (Pinzetten, Flaschenverschlüsse) konnten, nach dem sie mittels Chloroform gereinigt und in Alufolie eingeschlagen waren, durch trockene Hitze (3 h bei 200°C) im Trockenschrank sterilisiert werden. Der Chloroform-Reinigungsschritt dient der Inaktivierung der RNasen. Bei Behandlung von Plastikmaterial zum Beispiel der Eppendorf Safe-Lock 1,5 ml Reaktionsgefäße oder der Pipettenspitzen musste auf die beschränkte thermische und chemische Beständigkeit des Kunststoffes Rücksicht genommen werden. Deswegen wurden Kunststoffmaterialien entweder steril gekauft oder unsterile chloroformiert und autoklaviert. Um RNase-freie Lösungen herzustellen, ist Diethylpyrocarbonat (DEPC) der wichtigste RNase-Inhibitor. Infolgedessen wurden die Chemikalien mit 0,1 % DEPC-H₂O versetzt und bei 37°C für 24 h im Brutschrank inkubiert. Da jedoch selbst Spuren von

DEPC-Adenylresten carboxymethylieren und damit zum Beispiel die *In vitro*-Translation von mRNA inhibieren, muss das DEPC anschließend quantitativ durch fünfzehnminütiges Autoklavieren bei 100°C zersetzt werden.

3.5.1 Isolierung von Total-RNA aus Zellkultur mit der TRIzol[®] Methode

TRIzol[®]-Reagenz (Invitrogen)

70 % Ethanol-DEPC

Chloroform

Die Zellen wurden zunächst durch Resuspension von „TRI[®]zol-Reagenz“ und einem Wasserbad anschließend bei 30°C und 15 min lysiert. Das Reagenz, eine monophasische Lösung bestehend aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, hat die Eigenschaft, Zellen zu zerstören, gleichzeitig jedoch die Integrität der RNA während der Isolierung beizubehalten. Mittels Zugabe von 0,2 ml Chloroform gefolgt von 15-minütiger Zentrifugation mit 14000 rpm bei 4°C wurde das Gemisch in eine wässrige und eine organische Phase aufgetrennt. Die obere wässrige Phase mit RNA als Inhalt wurde abgezogen und in ein neues Eppendorf Safe-Lock 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend folgte eine Wiederholung des letzt genannten Schrittes. In Gegenwart von Salz und Alkohol wurde die RNA gefällt. Mit Hilfe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 7,0), des dreifachen Volumens 100 % Ethanol (eiskalt) und anschließend guten Mischens erfolgte die Fällung bei -20°C über Nacht. Das Präzipitat wurde am nächsten Tag durch Zentrifugation gesammelt. Es erfolgte eine Zentrifugation mit 14000 rpm für 30 min bei 4°C, um das Pellet niederzuschlagen. Ohne das Präzipitat zu berühren, wurde der Überstand nach Fällung mit einer Pipette abgezogen. Durch Zusatz von 1 ml 70 % Ethanol (eiskalt) und erneuter Zentrifugation mit 14000 rpm für 30 min bei 4°C wurde das Präzipitat im nächsten Schritt gewaschen, um die restlichen Salze zu entfernen. Im Anschluss daran stand das RNA-Pellet im geöffneten Eppendorf Safe-Lock 1,5 ml Reaktionsgefäße für 10 min auf Eis an der Luft bei Raumtemperatur, um Spuren an Ethanol zu entfernen. Abschließend wurde das Präzipitat in 25 µl DEPC-H₂O aufgenommen und bei 30 min geschlossen auf Eis gelagert, um nicht vollständig zu trocknen und damit nur langsam wieder in Lösung gehen zu können.

3.5.2 Elektrophoretische Auftrennung von Total-RNA im Formaldehydgel

10 x MOPS-Puffer	0,2 M Mops 0,05 M Natriumacetat 0,01 M EDTA mit NaOH auf pH 5.5-7 einstellen
RNA-Probenpuffer	720 µl deionisiertes Formamid 160 µl 10 x MOPS-Puffer 360 µl H ₂ O-DEPC 100 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) 80 µl Glycerol 80 µl gesättigte Bromphenolblau-Lösung
1 % SDS	10 g SDS ad 1 l H ₂ O _{dd}
Formaldehyd-Gel	2,7 ml 37 % Formaldehyd 5,0 ml 10 x MOPS-Puffer ad 50 ml H ₂ O _{dd}

Durch eine denaturierende Gelelektrophorese lässt sich am einfachsten die Intaktheit der RNA-Präparation überprüfen. Da einzelsträngige Polynukleotidketten dazu neigen, sich durch intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zu falten, müssen doppelsträngige Bereiche durch Denaturierung voneinander getrennt werden. Unterschiedliche RNA-Fragmente wurden auf einem 1 % Agarose-Gel ihrer Größe nach aufgetrennt. Dazu wurde 0,5 g Agarose in 45 ml H₂O gegeben, in der Mikrowelle aufgeköcht und anschließend mit 5 ml MOPS versetzt. Die Inkubation erfolgte in einem Wasserbad bei 50°C über 30 min. Da es sich um ein denaturierendes Agarosegel handelt, wurden 2,7 ml 37 % Formaldehyd als Denaturierungsmittel hinzugefügt. Zur Inaktivierung der ubiquitär vorkommenden RNasen wurden Gelkammer, Schlitten, Trennwände und Kamm 30 min in einer 1 % SDS Lösung inkubiert.

Die Aldehydgruppen des Formaldehyds bilden mit den Aminogruppen der Nukleotidbasen Schiff'sche Basen. Diese Aminogruppen stehen dann nicht mehr zur Ausbildung von H-Brücken zur Verfügung und die RNA bleibt linear. Als Laufpuffer diente der MOPS-Puffer. In einem Wasserbad bei 65°C für 5 min und anschließend sofortiger Lagerung auf Eis wurde die RNA-Probe vor dem Auftragen auf das Gel denaturiert. Zur Auftrennung wurde 1 µl der zu untersuchenden denaturierten RNA-Lösung mit 2 µl 10 x Probenpuffer in die Taschen des

Agarosegels, das sich in horizontalen Laufkammern befand, pipettiert und ein elektrisches Feld von 80 V angelegt. Als Molekulargewichtsmarker diente der „RNA Ladder“ (New England Biolabs). Durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid, konnte die RNA hinterher durch UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht werden. Zwei diskrete Banden für die 18S (1.9 kb bei menschlicher RNA) und 28S (5.1 kb bei menschlicher RNA) rRNA zeigten eine intakte Präparation an, wie in Abbildung 3.1 in Bande drei zu erkennen ist. Schwächere Fluoreszenz zwischen beiden Banden und unterhalb der kleineren Banden stammt von mRNA. Schmierungen der Banden zum unteren Ende des Gels deuten auf den teilweise stattgefundenen Abbau der RNA hin.

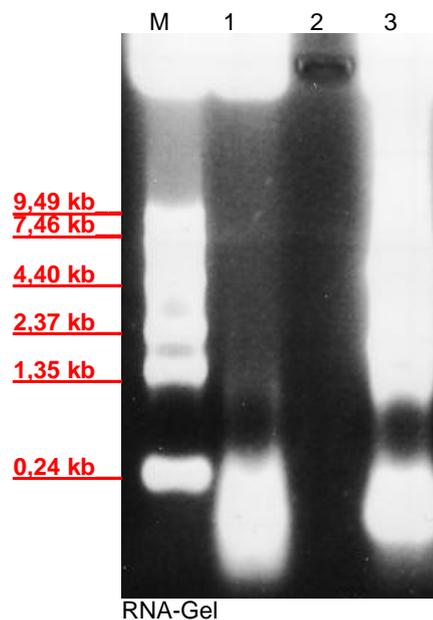


Abbildung 3.1: Qualitätskontrolle von Gesamt-RNA durch Ethidiumbromid-Färbung

M: Größenmarker RNA Ladder (New England Biolabs). **1:** TX3868, degradierte RNA. **2:** frei. **3:** TX3868, intakte RNA-Präparation. 1,15 µg Gesamt-RNA aus der Glioblastom-Zelllinie TX3866 wurden durch denaturierende Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Molmasse aufgetrennt

3.6 Isolierung von Micro-RNA

3.6.1 Isolierung mittels Ambion flashPAGE™ Fractinator

Der „flashPage™ Fractionator“ ist eine Miniatur-Elektrophorese, die es ermöglicht kleine, einzelsträngige Nukleinsäuren aus zum Beispiel Total-RNA-Präparationen zu isolieren. Vor jeder Benutzung musste die „Lower Buffer Chamber“ mittels 1 ml Dekontaminationslösung und 1 ml 0,1 % DEPC-H₂O gewaschen werden.

Nach diesem Waschvorgang wurden 250 µl des „flashPAGE Lower Running Buffer“ in den „Lower Buffer Chamber“ pipettiert. Anschließend folgte das Einsetzen des „flashPAGE Pre-cast Gels“, in welches 250 µl „Upper Running Buffer“ pipettiert wurden.

Es folgte eine Invertierung der 23 µl RNA-Probe und des „flashPAGE Gel Loading Buffer A40“ zu gleichen Volumenanteilen, sodass ein Endvolumen von 100 µl erreicht wurde. Durch ein Wasserbad von 95°C für 2 min und anschließende Lagerung auf Eis waren die Nukleinsäuren denaturiert, einzelsträngig und somit einsetzbar. Für die eigentliche Elektrophorese wurde die RNA-Präparation auf die Geloberfläche des „flashPAGE Pre-cast Gels“ gegeben und der „flashPage™ Fractionator“ vorsichtig verschlossen. Der angeschlossene „Power supply“ lief bei 75V für 12 min oder solange, bis der „Lower Buffer“ bläulich schimmerte. Sobald dies der Fall war, wurde der „flashPAGE Fractinator“ geöffnet und das „flashPAGE Pre-cast Gel“ entfernt. Nach Transferierung des „Lower Running Buffers“, welcher die <40 nt Nukleinsäurefraktionen enthält, in ein Eppendorf Safe-Lock 1,5 ml Reaktionsgefäß, wurde die Fällung durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 7,0) und des dreifachen Volumens 100 % Ethanol bei -20°C über Nacht begonnen. Weitere Schritte folgten analog der RNA-Fällung. Die Fraktionierung mittels Polyacrylamidgel führt zu einer zehntausendfachen Anreicherung der RNA-Population in den Größen zwischen 15 und 40 Nukleotiden. Somit ermöglicht diese Methode eine 80 % Ausbeute an miRNA aus der gesamten RNA und enthält die für die Total-RNA repräsentative relative Häufigkeit der isolierten miRNAs.

3.6.2 Gelstar®-Platte zur Konzentrationsbestimmung

Für die Herstellung einer Gelstar®-Platte wurden 25 µl Agarose mit 2,5 µl Gelstar® in einem Erlenmeyerkolben zusammengefügt, anschließend schnell in eine Petrischale gegeben und zur Polymerisation in einen abgedunkelten Raum abgestellt.

Die Gelstar®-Platte dient als Qualitätskontrolle zur Konzentrationsbestimmung der Produkte des „flashPage™ Fractionators“. Dazu wurde eine definierte RNA-Menge gegen jeweils 1 µl der miRNA-Fractionen aufgetragen.

3.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht enzymatisch *in vitro* die Herstellung einer millionenfachen Kopie bestimmter Nukleotidsequenzen. Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase, ausgehend von Startermolekülen, einen neuen DNA-Strang an einer einzelsträngigen Nucleinsäurematrize, der Template-DNA.

An diese nun einzelsträngig vorliegende Template-DNA hybridisieren synthetische DNA-Oligonukleotide (Primer), welche als Startermoleküle verwendet werden. Eine hitzestabile DNA-Polymerase synthetisiert, vom 3'-Ende des Templates ausgehend, einen neuen DNA-Doppelstrang. Durch eine mehrfache Wiederholung dieser Schritte erfolgt eine exponentielle Amplifikation.

Der erste Schritt beginnt mit der thermischen Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges, indem sie bei 90-94°C aufgeschmolzen wird. Daraus entstehen dann einsträngige DNA-Template-Moleküle. Im zweiten Schritt, der sogenannten „Annealing“-Phase, erfolgt eine Primer-Hybridisierung an einzelsträngige DNA. Die bevorzugte Temperatur der synthetischen Oligonukleotide für die Bindung an die komplementäre Sequenz der Template-DNA liegt meistens bei über 50°C. Danach folgt im letzten Schritt eine Basenpaarung, welche die Amplifizierung der dazwischen gelegenen Sequenzabschnitte einleitet. Diese Extension erfolgt bei 72°C und einem bei dieser Temperatur aktiven Enzym, der Taq-Polymerase. Sie erlaubt die kontinuierliche Durchführung der PCR-Zyklen ohne zwischenzeitliche neue Enzymzugabe pro Zyklus. Durch Anhängen von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) synthetisiert die Polymerase an das 3'-Ende der Primer eine zur Matrize komplementäre DNA-Sequenz. Die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, welche die exponentielle Amplifizierung der Matrize ermöglicht, ist das entscheidende Prinzip der PCR.

3.7.1 PCR-Bedingungen

Bei der high fidelity-PCR werden in der Regel aus *Pyrococcus* isolierte Polymerasen eingesetzt, die neben der Polymeraseaktivität auch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzen. Diese zweite Aktivität erkennt falsch eingebaute Nukleotide und ersetzt sie durch die richtigen, zum Template-Strang komplementären. Deshalb wird diese Aktivität auch als *proofreading*-Aktivität bezeichnet. Durch die Verwendung solcher *proofreading*- oder *high fidelity*-Enzyme wird eine etwa zehnmal geringere Fehlerrate erreicht.

Ein nachteiliger Effekt der 3'-5'-Exonukleaseaktivität ist jedoch der Abbau von Primer-Molekülen und Template-DNA. Das kann besonders während dem Ansetzen der PCR und

in den ersten PCR-Zyklen zu unerwünschten Nebenreaktionen führen. Die Reaktionsbedingungen für *proofreading*-DNA-Polymerasen sind daher schwieriger zu optimieren als für die Taq-DNA-Polymerase. Allerdings eignen sie sich ideal für alle PCR-Amplifikationen, bei denen es auf eine niedrige Fehlerrate bei der Amplifikation des PCR-Produkts ankommt.

In den ersten Denaturierungsreaktionen wurde den miRNA-Proben zunächst der hsa-miR Primer *rt6-hsa-miR* hinzugegeben, der 6 Basenpaare der hsa-miR bindet und sie auf eine Größe von 36 Basenpaaren bringt. Im weiteren Verlauf wurde die miRNA durch eine RT-PCR-Reaktion in cDNA umgeschrieben und über Nacht gefällt. Mit Hilfe eines hsa-miR-Primers (*short-miR-reverse*) und den spezifischen Adaptorprimern (*mp for*, *mp rev*) wurde die cDNA-miRNA in einer PCR-Reaktion vervielfältigt.

Ein typischer Reaktionsansatz für eine solche PCR setzt sich wie folgt zusammen:

10 µl	5 x Puffer (Finnzymes)	(2 U/µl)
0,5 µl	Nukleotidgemisch	(20 mM dNTP)
0,5 µl	Primer forward	(50 µM)
0,5 µl	Primer reverse	(50 µM)
2,0 µl	short-miR-reverse	(0,5 µM)
0,5 µl	Phusion [®] DNA Polymerase (Finnzymes)	(100 U/50 µl)
2,0 µl	miRNA-cDNA	
<hr/>		
	H ₂ O _{dd} auf 50 µl	

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde nach dem folgenden Temperatur-Profil im PTC-100 Thermal Controlled Cycler (MJ Research Inc.) durchgeführt:

98°C	10 min	} 40 Zyklen
98°C	30 sec	
59°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	2 min	
8°C	∞	

Anschließend wurden Reaktionsansätze mit je 1 µl DNA-Probenpuffer versetzt und in einem Gel aus 3 % NuSieve-Agarose-Gel/1 x TAE aufgetrennt.

Der short-miR-reverse-Primer bindet an 16 Basenpaaren, sodass die miRNA eine Größe von 47 Basenpaaren haben und mit Amplifikation durch die spezifischen Adaptorprimer eine Länge von 83 Basenpaaren einnehmen.

Es folgte eine Isolierung der aufgetrennten DNA aus dem Agarose-Gel mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen®) und eine Fällung des Eluats, welches anschließend aufgereinigt in einer erneuten PCR-Reaktion amplifiziert wurde, die sich aus folgenden Komponenten zusammensetzte:

10 µl	5 x Puffer (Finnzymes)	(2 U/µl)
0,5 µl	Nukleotidgemisch	(20 mM dNTP)
0,5 µl	Primer forward	(50 µM)
0,5 µl	Primer reverse	(50 µM)
0,5 µl	Phusion® DNA Polymerase (Finnzymes)	(100 U/50 µl)
2,0 µl	Eluat	
<hr/>		
	H ₂ O _{dd} auf 50 µl	

Diese PCR hatte folgendes Temperaturprofil:

98°C	30 sec	} 40 Zyklen
59°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	10 min	
8°C	∞	

Auch dieser Reaktionsansätze wurde mit je 1 µl DNA-Probenpuffer versetzt und in einem Gel aus 3 % NuSieve-Agarose-Gel/1 x TAE aufgetrennt.

3.7.2 Global Amplification Kit®

Das Global Amplification Kit® (System Biosciences) erlaubt die gleichmäßige und reproduzierbare Amplifikation der in begrenzten Mengen vorhandenen RNA, um der anschließenden PCR ausreichende Matrizen kleiner auserwählter RNA Gentranskripten zu verschaffen. Diese Methode beinhaltet 3 Schritte, die zuvor eine Größenselektion der kleinen RNAs voraussetzt. Anschließend erfolgt im ersten Schritt eine Ligation eines Adapter an das 3'-Ende der RNA. Aus der Reverse Transkription mit Ligation eines Adapters an das 5'-Ende entsteht im zweiten Schritt die cDNA, welche im letzten dritten Schritt mittels PCR amplifiziert wird.

Der amplifizierte Prozess sollte cDNA-Produkte mit der Größe zwischen 150 bp bis 1500 bp bilden. Bei diesen Produkten kann es sich, abhängig vom Ausgangsmaterial, um intakte oder degradierte RNA handeln, die unterschiedlich aussehen.

Im ersten Schritt wurden die miRNA-Fraktionen mittels flashPAGE™ Fractorator aus totaler RNA isoliert. Für die folgende Adapter-Ligation wurde die miRNA-Probe zunächst für 5 min bei 65°C denaturiert. Damit sich die gelösten intra- und intermolekularen Sekundärstrukturen nicht wieder regenerierten, wurde die Probe auf Eis inkubiert.

In jede miRNA-Probe wurde folgendes hinzugegeben:

2,0 µl	RNase-freies Wasser
5,0 µl	Ligase Puffer (vor Benutzung bei 37°C aufwärmen)
0,5 µl	3'-Adaptor
2,0 µl	miRNA-Template
0,5 µl	Ligase Cocktail
<hr/>	
10,0 µl	Ansatz

Anschließend folgte eine Inkubation der Reaktion bei 37°C für 1 Stunde. Danach wurde die Probe auf Eis gelagert, bis die RT-Reaktion stattfand. Um den ersten Strang der cDNA herzustellen, wurden folgende Komponenten hinzugegeben:

4,0 µl	RNase-freies Wasser
0,5 µl	3'-Adaptorprimer
1,0 µl	Ligation
	(aus dem vorherigen Ansatz)
<hr/>	
5,5 µl	Ansatz

Dieser Schritt wurde bei 65°C für 1 min und dann bei 42°C für 5 min inkubiert. Während dessen wurde ein Master Mix mit folgenden Komponenten angesetzt und der oberen Reaktion hinzugefügt:

2,0 µl	5 x Reverse Transkriptase Puffer
1,0 µl	dNTP Mix
0,5 µl	5'-Adaptor
0,5 µl	Dithiothreitol (DTT)
0,5 µl	Reverse Transkriptase
<hr/>	
4,5 µl	Ansatz

Es folgte eine weitere Inkubation für 5 min bei 42°C und bei 95°C für 10 min.

Die *first-strand* cDNA konnte bei -20°C gelagert werden, bis die *second-strand* cDNA Synthese und Amplifikation begonnen wurde. Für die *second-strand* cDNA Synthese und Amplifikation wurde zu jeder *first-strand* Synthese-Reaktion aus dem vorherigen Ansatz folgendes beigefügt:

77 µl	RNase-freies Wasser
10 µl	10 x PCR Puffer
2 µl	dNTP Mix
4 µl	3'-Adaptorprimer
4 µl	5'-Adaptorprimer
3 µl	PCR Polymerase
<hr/>	
100 µl	Ansatz
	(inklusive 10 µl aus dem vorherigen Ansatz)

Die anschließende Polymerase-Ketten-Reaktion wurde nach dem folgenden Temperatur-Profil im PTC-100 Thermal Controlled Cycler (MJ Research Inc.) durchgeführt:

95°C	2 min	
95°C	20 sec	} 40 Zyklen
55°C	15 sec	
72°C	15 sec	
72°C	30 sec	
15°C	∞	

Anschließend wurden beide Reaktionsansätze mit je 5 µl DNA-Probenpuffer versetzt und in einem Gel aus 3 % Agarose/1 x TAE aufgetrennt. Es folgte eine Isolierung der aufgetrennten DNA aus dem Agarose-Gel mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen®).

3.8 Reverse Transkriptase Reaktion (RT-PCR)

Da sich die RNA nicht direkt als Template in einer PCR einsetzen lassen kann, können mithilfe der Reversen Transkriptase-PCR (RT-PCR) spezifische RNA-Sequenzen zunächst in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umschrieben und anschließend amplifiziert werden. Besondere Bedeutung hat diese Methode, wenn seltene Transkripte nachgewiesen und analysiert werden sollen. Im Vergleich zu anderen RNA-Nachweisverfahren, wie zum Beispiel der Northern-Blot-Analyse, ist die Sensivität der RT-PCR erheblich höher. Man hatte schon lange vor der Entdeckung des Enzyms durch Baltimore und Temin 1970 in RNA-Viren die Existenz der Reversen Transkriptase vermutet. Die Aufgabe der Reversen Transkriptase ist die Überführung der RNA in eine komplementäre DNA, kurz cDNA genannt. Die Reaktion läuft in Gegenwart von Startermolekülen (Primern), dNTPs und einem geeigneten Puffer ab. Die Primer binden an die RNA und werden an ihrem 3'-OH-Ende komplementär zur RNA-Matrize verlängert. Häufig wird der Reaktion ein RNase-Inhibitor hinzugefügt, um die RNA vor RNase zu schützen. Ziel ist es, die Sicherheit und Reproduzierbarkeit der cDNA-Synthese zu erhöhen. Diese kann dann ohne weitere Aufarbeitung direkt als Template für die Polymerase-Kettenreaktion verwendet werden. Eine solche RT-PCR ermöglicht selbst geringste Mengen an RNA-Molekülen nachzuweisen oder zu quantifizieren. Der cDNA-Einzelstrang kann in einer nachfolgenden Reaktion (Zweitstrangsynthese) zum Beispiel über PCR in eine doppelsträngige cDNA überführt werden. Doppelsträngige cDNA-Moleküle sind klonierbar und können für RNA-Amplifikationsreaktionen verwendet werden.

3.8.1 RT-PCR Bedingungen

Hinsichtlich der Durchführung einer RT-PCR kann prinzipiell zwischen einer *two step*-RT-PCR und einer *one-step*-RT-PCR unterschieden werden. Bei der hier angewendeten two-step Variante erfolgte zunächst die cDNA-Erststrangsynthese (reverse Transkription) mit miRNA als Template. Eine Probe dieser RT-Reaktion wurde dann in einer nachfolgenden PCR eingesetzt, in der die gebildete cDNA wiederum als Template dient. Dadurch können in den beiden Reaktionen die Bedingungen optimal auf die jeweils verwendeten Enzyme eingestellt werden. Zudem kann aus einer einzigen cDNA-Synthese eine Vielzahl von Transkripten (20-100) amplifiziert werden.

Für die cDNA-Erststrangsynthese aus miRNA wurde der „Omniscript RT Kit“ der Firma Qiagen® verwendet. Die verwendete Omniscript Reverse Transkriptase unterscheidet sich von den üblich benutzten, natürlich vorkommenden Reversen Transkriptasen der RNA enthaltenden Retroviren. Diese im Kit enthaltende Reverse Transkriptase ist ein in *E.coli* exprimiertes, rekombinantes heterodimeres Enzym, welches sowohl eine RNA-abhängige als auch eine DNA-abhängige DNA-Polymerasefunktion und eine RNaseH-Funktion besitzt. Um eine amplifizierbare miRNA-cDNA aufzubauen, musste die miRNA zunächst in einer RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben werden.

Der erste Reaktionsschritt wurde folgendermaßen, möglichst auf Eis, angesetzt:

2,5 µl	rt6-hsa-miR-26a-2/16/21
2,0 µl	miRNA-Template aus flashPage™ Fractionator
<hr/>	
4,5 µl	Ansatz

Der Primer und miRNA wurden gemischt und bei 70°C für 5 min denaturiert, um Sekundärstrukturen aufzuschmelzen. Um eine Renaturierung zu verhindern, wurde die denaturierte Primer-miRNA-Mischung auf Eis abgekühlt. Der folgende Reaktionsansatz wurde der denaturierten miRNA zugegeben:

1 µl	10 x Reverse Transkriptase Puffer
1 µl	dNTP Mix (5 mM jedes dNTP)
0,5 µl	Omniscript Reverse Transkriptase
0,5 µl	RNase Inhibitor (10 Units/µl)
2,5 µl	RNase-freies Wasser
<hr/>	
5,5 µl	Ansatz

Es folgte eine Inkubation der Reversen Transkriptase-Reaktion im Wasserbad für 5 min bei 37°C und 1h bei 42°C. Im nächsten Schritt folgte eine Inaktivierung der Reversen Transkriptase im Heizblock bei 70°C für 10 min. 1-8 µl der entstandenen cDNA konnten nun in eine 50 µl PCR überführt oder bei -20°C über Nacht eingefroren werden.

3.9 Genexpressionsanalyse mit DNA-Microarray

DNA-Microarrays können als eine Weiterentwicklung des Southern-Blottings aufgefasst werden: Immobilisierte einzelsträngige DNA bindet bei Vorliegen von Basenkomplementarität gelöste Nukleinsäuren. Per Definition werden dabei die immobilisierten Nukleinsäuren Proben genannt, während die gelösten Nukleinsäuren als Sonden bezeichnet werden. Anders als beim Southern Blotting werden die Proben bei DNA-Microarrays auf ein festes Trägermaterial aufgetragen. Dieses ermöglicht eine deutlich höhere Packungsdichte mit DNA-Proben und erleichtert die praktische Durchführung des Hybridisierens und Waschens. In den meisten Fällen wird Glas als Trägermaterial benutzt, weil dieses besonders günstige Eigenschaften besitzt. Zum Beispiel deformiert Glas weder bei Kontakt mit Flüssigkeit noch während des Trocknens. Dadurch wird sowohl die Handhabung der cDNA-Microarrays als auch die abschließende Auswertung über softwaregestützte Bildauswertung erheblich vereinfacht. Dank dieser Fortschritte konnte der Durchmesser für die DNA-Proben gesenkt werden und liegt typischerweise zwischen 20 µm und 200 µm, sodass mehrere Tausend DNA-Spots auf der Fläche eines Objektträgers Platz finden. Als Proben können synthetische Oligonukleotide oder cDNA-Klone (bzw. PCR-Produkte der cDNA-Klone) eingesetzt werden: Erstere werden für Oligonukleotid-Microarrays benutzt, letztere verwendet man für cDNA-Microarrays. Die Markierung von Sonden erfolgt in den meisten Fällen mit fluoreszierenden Farbstoffen, in diesem Fall wurde Cyanine-5 eingesetzt. Microarrays werden üblicherweise zur Messung der Genexpression eingesetzt. Dazu wurde zunächst die miRNA der zu untersuchenden Zellkultur isoliert. Anschließend wurde die miRNA-Population mithilfe einer Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben und dabei gleichzeitig markiert. Markierte Sonden werden in einem geeigneten Puffer aufgenommen und während der Hybridisierung mit den immobilisierten Sonden in Kontakt gebracht. Aufgrund der Basenkomplementarität kommt es zu Interaktionen, bei denen man drei Ziele verfolgt: Einerseits soll das Verhältnis aus Signal zu Hintergrundrauschen möglichst groß sein. Andererseits muss eine Kreuzhybridisierung aufgrund partieller Homologien zwischen markierten Sonden und immobilisierten Proben vermieden werden. Außerdem sollte die Signalstärke der Konzentration an markierter Sonde proportional sein. Um diese Eigenschaften zu erhalten, müssen die experimentellen Parameter angepasst werden: Puffer mit hoher Ionenstärke werden eingesetzt, um die elektrostatische Abstoßung zwischen Nukleinsäuren zu minimieren, wodurch die Anlagerung komplementärer Stränge erleichtert wird. Hintergrundrauschen wird durch die Zugabe von Detergenzien oder sogenannter blockierender Reagenzien verringert.

Die Hybridisierung erfolgt unter stringenten Bedingungen, um Kreuzhybridisierung zu vermeiden. Während der Hybridisierung liegt die immobilisierte DNA-Probe in mindestens zehnfachem Überschuss vor. Dadurch erreicht man, dass die Interaktion zwischen Sonde und Probe über einen weiten Konzentrationsbereich hinweg einer Kinetik erster Ordnung folgt. Nach der Hybridisierung werden ungebundene Sonden durch Waschen entfernt. Die Fluoreszenz der DNA-Proben, die an Sonden gebunden sind, kann mithilfe eines Scanners detektiert und anschließend quantifiziert werden. Die Intensität dieses Signals hängt von der Menge fluoreszenzmarkierter Sonden-Moleküle ab, die zur jeweiligen DNA-Probe Basenkomplementarität aufgewiesen haben. Man misst also die Menge an miRNA, die von einem bestimmten Gen transkribiert wurde. In dieser Arbeit wurden Arrays benutzt, bei denen in BACs und Cosmide einklonierte DNA des genomischen Bereichs 12q13-21 (RP11) mittels DOP-PCR amplifiziert und auf Objektträger aufgespottet wurden (88 unterschiedliche Spots). Die BACs/Cosmide enthielten zwischen 100-200 kb DNA. Hybridisiert wurden diese Arrays mit Cy5-markierter cDNA der Zelllinie des TX3868.

Nach der Hybridisierung werden ungebundene Nukleinsäuren durch Waschen entfernt. Ein Scanner (ScanArray™ Lite Microarray Scanner (PerkinElmer)) ermittelt die Fluoreszenzintensität von Cyanine-5, die sich aufgrund der Absorptions- und Emissionswellenlänge detektieren lässt. Durch softwaregestützte Bildauswertung, ScanArray Express Microarray Acquisition and Analysis Software, Version 2.0, PerkinElmer, werden die Mittelwerte der Fluoreszenz-Intensitäten für jeden DNA-Spot des Microarrays ermittelt.

3.9.1 Herstellung der markierten Sonden

Vor der Hybridisierung wurde die amplifizierte miRNA, welche bereits durch das Global Amplification Kit® in eine einzelsträngige cDNA umgeschrieben war, mit Cy5-dCTP fluoreszenzmarkiert.

Die Markierungsreaktionen wurden nach folgendem Schema angesetzt:

10 µl	5 x Puffer (Finnzymes)	(2 U/µl)
0,5 µl	Nukleotidgemisch	(20 mM dNTP)
0,5 µl	Primer forward	(50 µM)
0,5 µl	Primer reverse	(50 µM)
0,5 µl	Phusion® DNA	(100 U/50 µl)
0,5 µl	Cyanine-5-dCTP	(1 mM, PerkinElmer)
2,0 µl	miRNA-cDNA	
<hr/>		
	H ₂ O _{dd} auf 50 µl	

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde nach dem folgenden Temperatur-Profil im PTC-100 Thermal Controlled Cycler (MJ Research Inc.) durchgeführt:

95°C	2 min	} 25 Zyklen
95°C	20 sec	
55°C	15 sec	
72°C	15 sec	
72°C	30 sec	
15°C	∞	

Anschließend folgte durch Zugabe von 20 µl ssssDNA, 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 7,0) und des dreifachen Volumens 100 % Ethanols (eiskalt) die Fällung bei -20°C über Nacht. Das Präzipitat wurde am nächsten Tag bei 4°C und 14000 rpm abzentrifugiert und mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen.

3.9.2 Hybridisierung der Arrays

20 x SSPE	175,3 g	NaCl
	27,6 g	NaH ₂ PO ₄ -1*H ₂ O
	7,4 g	Na ₂ EDTA
		pH 7,4
Dextransulfat-Lösung (5 ml)	2,5 ml	50 % Formamid/2 x SSPE
	0,5 ml	deionisiertes Formamid
	2 ml	20 x SSPE
	1 g	H ₂ O _{dd}
		Dextransulfat
		3 h bei 70°C lösen
Hybridisierungslösung (100 µl)	50 µl	Dextransulfat/SSPE
	15 µl	27 % SDS
	20 µl	H ₂ O _{dd steril}
	15 µl	20 x SSPE
Prähybridisierungslösung (100 µl)	70 µl	deionisiertes Formamid
	10 µl	20 x SSPE
	20 µl	H ₂ O _{dd steril}

Die fluoreszenzmarkierte cDNA-Probe wurde auf Glasobjektträger hybridisiert. Für die Hybridisierungen wurde das Pellet der bereits gefällten cDNA-Sonde in 12,5 µl der Prähybridisierungslösung gelöst und für 10 min bei 75°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis inkubiert. Der Array wurde zunächst 5 min bei RT mit 100 µl Prähybridisierungslösung prähybridisiert, anschließend bei 80°C auf der Heizplatte bei 2,5 min inkubiert. Während dieser Prähybridisierung bei 80°C wird die aufgespottete DNA denaturiert, also einzelsträngig gemacht. Um ein Renaturieren zu verhindern, wurde der Array nach der Denaturierung zügig in eine Küvette mit eiskaltem (-20°C) 70 % Ethanol gestellt und unter 5 min Schütteln gewaschen. Es folgten drei weitere Waschschriffe für 5 min mit einer ansteigenden Ethanolreihe (2 x 70 %, 1 x 80 %, 1 x 96 %). Die Hybridisierung der Spots mit der Sonde erfolgte auf einer 40°C warmen Heizplatte.

Es wurden 50 µl des Hybridisierungsansatzes auf das untere Drittel der gespotteten Seite des Microarrays pipettiert. Durch Auflage eines Deckglases wurde die Hybridisierungslösung luftblasenfrei zwischen Microarray und Deckglas verteilt. Zur Fixierung des Deckglases wurde in der Mitte der beiden schmalen Seiten ein kleiner Punkt Klebstoff (Fixogum) aufgetragen. Anschließend kam der Array in eine Hybridisierungskammer über Nacht bei 37°C.

3.9.3 Waschen der Arrays

25 % Formamid/4 x SSPE	50 ml	Formamid
	40 ml	20 x SSPE
		ad 110 ml H ₂ O _{dd}
		30 min bei 34°C lösen

Nach der Hybridisierung wurden die Arrays dreimal bei 5 min durch das in 30 min bei 34°C vorgewärmten 25 % Formamid/4 x SSPE unter Schütteln gewaschen. Danach folgten weitere zwei Waschschriffe für 5 min mit 2 x SSPE (RT). Durch die mit steigender Stringenz durchgeführten Waschvorgänge wurde nicht ausreichend gebundene DNA von der Trägermatrix entfernt. Es galt zu beachten, dass nach dem ersten Waschschriff alle Deckgläser von den Microarrays gelöst wurden. Außerdem wurden nach dem letzten Waschschriff die sich noch auf dem Microarray befindlichen Kleberreste abgelöst, da diese den Scanvorgang der Objektträger beeinflussen konnten.

Die Schlierenbildung sollte durch anschließende Zentrifugation für 4 min bei 2000 rpm verhindert werden. Da die Ergebnisse dieses Arrays unspezifisch waren, wurde eine höhere Temperatur und eine geringere Salzkonzentration gewählt, um eine höhere Stringenz und

somit ein spezifischeres Ergebnis zu erhalten. So wurden die Arrays dreimal bei 5 min durch das in 1h bei 39°C vorgewärmte 25 % Formamid/4 x SSPE unter Schütteln gewaschen, die zwei weiteren Waschschrirte für 5 min folgten mit 1 x SSPE (RT).

3.9.4 Auswerten der Arrays

Die fertig getrockneten, hybridisierten Microarrays wurden aus der Hybridisierungsstation entnommen und bis zum Einscannen, das zeitnah folgte, trocken und dunkel aufbewahrt. Die Microarrays wurden mit dem ScanArray Express Microarray Scanner (PerkinElmer) eingescannt. Die Bilder des Cy5-Kanals wurden bei einer Anregungswellenlänge von 649 nm und einer Emissionswellenlänge von 670 nm direkt erzeugt und als 16 bit Tiff-Dateien abgespeichert. Die mit dem „ScanArray Express Microarray Scanner“ (PerkinElmer) erzeugten 16 bit Tiff-Dateien konnten mit Hilfe der dazugehörigen Bildanalysesoftware (ScanArray Express Microarray, Acquisition and Analysis Software, Version 2.0, PerkinElmer) in Rohdaten umgewandelt werden. Punkte wurden den Signalen zugeordnet und manuell, falls nötig, nochmals korrigiert. Automatisch wiederum wurden daraufhin Intensitätswerte berechnet und tabellarisch ausgegeben. Dabei wurden Vordergrund, Hintergrundwerte (Mean, Median und Mode), die Qualität der Spots sowie weitere Parameter aufgelistet.

Für jeden Spot wurde eine „Ratio of Medians“ berechnet. Die einzelnen 88 BACs und Cosmide sind auf dem Array jeweils dreifach, in drei Subarrays, aufgespottet. Von den „Ratio of Medians“ der drei Subarrays wurde jeweils der Mittelwert der Fluoreszenz-Intensität \bar{x} und die Standardabweichung s nach unten stehenden Formeln berechnet:

Mittelwert der Fluoreszenzintensität:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

Standardabweichung:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

Die Mittelwerte der Fluoreszenz-Intensität \bar{x} wurden gegen einen Kontrollspot normalisiert. Der Kontrollspot enthält DOP-PCR amplifizierte genomische DNA.

3.10 Membranhybridisierung

3.10.1 Fixierung auf Nylonmembran

Die durch den Scannvorgang identifizierten BAC-Klone mit potentiell hybridisierten miRNAs wurden durch Zusatz von einer 0,4 molaren EDTA/NaOH-Lösung in einem Eppendorf Safe-Lock 1,5 ml Reaktionsgefäße für 5 min bei RT denaturiert. Jeweils 1 µl der denaturierten Proben wurde auf eine 2 cm x 2 cm lange Nylonmembran transferiert. Die entsprechenden Felder wurden markiert.

3.10.2 Hybridisierung der Membran

20 x SSPE	175,3 g	NaCl
	27,6 g	NaH ₂ PO ₄ -1*H ₂ O
	7,4 g	Na ₂ EDTA
		pH 7,4
Dextransulfat-Lösung (5 ml)	2,5 ml	50 % Formamid/2 x SSPE
	0,5 ml	deionisiertes Formamid
	2 ml	20 x SSPE
	1 g	H ₂ O _{dd}
		Dextransulfat
		3 h bei 70°C lösen
Hybridisierungslösung (1600 µl)	800 µl	Dextransulfat/SSPE
	240 µl	27 % SDS
	320 µl	H ₂ O _{dd}
	240 µl	20 x SSPE
25 % Formamid/ 4x SSPE	50 ml	Formamid
	40 ml	20 x SSPE
		ad 110 ml H ₂ O _{dd}
		pH 7,0
		30 min bei 34°C lösen

Die Membranen wurden zunächst angefeuchtet und anschließend in einem Eppendorf Safe-Lock 2,0 ml Reaktionsgefäße unter Zugabe von 100 µl Hybridisierungslösung für 1 Stunde bei 31°C im Hybridisierungssofen vorinkubiert. Wie bei den Arrays wurden die fluoreszenzmarkierten Sonden in 12,5 µl der Prähybridisierungslösung gelöst und zum Auflösen von Sekundärstrukturen für 10 min bei 75°C denaturiert und sofort auf Eis inkubiert. Die Sonden wurden der vorinkubierten Nylonmembran hinzugegeben und über Nacht im Brutschrank bei 31°C stehen gelassen. Am nächsten Tag folgte die Waschung der Membran. Die Blots wurden viermal bei 5 min durch das in 30 min bei 34°C vorgewärmte 25 % Formamid/4 x SSPE unter Schütteln gewaschen. Danach folgten weitere drei Waschschritte für 5 min mit 2 x SSPE (RT). Die gewaschenen Blots wurden in dünne Frischhaltefolie eingelegt, um ein Austrocknen bis zum Scannvorgang zu verhindern. Analog folgte auch hier eine Änderung in den Hybridisierungsbedingungen. Es wurde vorerst eine höhere Temperatur für die Inkubation der Hybridisierungsreaktion über Nacht gewählt, die zunächst bei 37°C und anschließend bei 39°C lag. Eine höheren Stringenz und somit ein spezifischeres Ergebnis wurde über das Waschen mit dem in 1 h bei 39°C vorgewärmten 25 % Formamid/4 x SSPE und der geringere Salzkonzentration des 1 x SSPE erreicht.

3.10.3 Reisolierung der gebundenen miRNAs

Die Detektion der Fluoreszenz der gebundenen Sonde erfolgte mit dem *Typhoon* Scanner (GE Healthcare). Die Signale wurden computergesteuert bei einer Auflösung von 50 µm und einer PMT-Einstellung von 300 detektiert und aufgezeichnet.

Nach dem die entsprechenden BAC identifizierten waren, wurden sie ausgeschnitten und getrennt jeweils in ein Eppendorf Safe-Lock 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben. Durch Zusatz von 20 µl H₂O_{dd steril} erfolgte anschließend die Denaturierung der gebundenen miRNAs durch Inkubation bei 95°C im Wasserbad für 20 min, wobei alle 2 min eine Durchmischung stattfand. Jeweils 1 µl der reisolierten miRNAs wurde mit 99 µl H₂O verdünnt, um mittels Photometer die Konzentration der Produkte bestimmen zu können. Die Menge der reisolierten miRNAs wurde bei -20°C eingefroren, um für spätere Sequenzierungsvorgänge weiterhin zur Verfügung zu stehen.

3.11 Klonierung mittels pGEMTeasy

Für die Klonierung doppelsträngiger cDNA wurde der Vektor pGEM-T-Easy genutzt. Der Einbau erfolgte über Homopolymerschwänze. Hierbei wurde der Vektor durch die Firma Promega mit dem Enzym Eco R V geschnitten und die Schnittstelle mit 3'-„T“-Überhängen versehen. An diesen 3'-„T“-Überhängen konnte das PCR-Produkt mit seinen „A“-Überhängen andocken. Weiterhin enthielt der Vektor pGEM-T-Easy sowohl einen T7- als auch einen SP6-RNA Polymerase Promotor. An diesen Promotoren konnte die T7- bzw. die SP6-Polymerase zu weiteren Zwecken binden. Zur Selektion von Bakterien ohne Vektor besitzt pGEM-T-Easy eine Ampicillinresistenz. Somit konnten auf ampicillinhaltigem Medium nur Bakterien wachsen, welche den Vektor eingebaut hatten. Ob der Vektor das cDNA-Fragment enthielt, wurde durch die so genannte „Blau-Weiß-Selektion“ getestet. Hierbei wurde das LacZ-Gen des Vektors benutzt, welches für die β -Galaktosidase kodiert. Dieses Enzym spaltet im Laktose-Metabolismus die Laktose in die Monosaccharidkomponenten Galaktose und Glukose. Dabei gehört die β -Galaktosidase zu den induzierbaren Enzymen, welche erst nach Induktion synthetisiert werden. Ein solcher Induktor ist auch Isopropylthiogalaktosid (IPTG), welcher strukturell der Allolaktose ähnelt, aber nicht abgebaut wird. Konnte so die Enzymsynthese vom LacZ-Gen ausgehend aktiviert werden, so erschienen diese Kolonien auf X-Gal-Medium, welches das Substrat darstellte, blau. Da die Bindungsstelle für die cDNA-Fragmente genau in diesem Gen lag, wurde bei cDNA-Fragmenteinbau das LacZ-Gen zerstört. Somit konnte keine β -Galaktosidase gebildet werden und diese Kolonien erschienen auf X-Gal-Medium weiß. Folgende Abbildung 3.9 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pGEM-T-Easy.

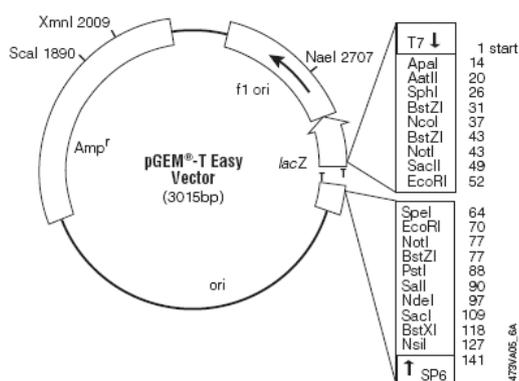


Abbildung 3.9: Plasmidkarte des Vektors pGEM-T-Easy

In den Promoterregionen für die T7- und SP6-Polymerase befinden sich verschiedene Schnittstellen für einige herkömmliche Enzyme.

3.11.1 Bakterienkulturen

Zur Vermehrung der cDNA-Fragmente dienen, in Form von kompetenten Zellen (Solopack[®]Gold competent cells, Stratagene) erhaltene, *E.coli*-Bakterien als Wirt. Diesen Bakterien fehlen alle bekannten *E.coli* Restriktions-Systeme (McrA-, McrCB-, McrF-, Mrr- und HsdR), wodurch eine Spaltung von methylierter DNA verhindert wird. Weiterhin fehlt die Endonukleaseaktivität (endA), womit sich die Qualität der präparierten DNA verbessert. Eine Verminderung der Neukombination (recA) bewirkt eine Stabilisierung des Inserts. Zusätzlich enthalten diese Bakterien ein lacIqZΔM15-Gen, wodurch ebenfalls eine „Blau-Weiß-Selektion“ möglich ist.

3.11.2 Ligation

Bei der Ligation werden DNA-Enden mit Hilfe einer T4-Ligase miteinander verbunden. Man unterscheidet hierbei eine Ligation mit glatten Enden, auch „blunt ends“ genannt, von einer Ligation mit überstehenden Enden, welches als „sticky ends“ bezeichnet wird. Da bei Verwendung der Taq-Polymerase an die freien Enden der entstehenden cDNA-Fragmente schon automatisch ein dATP angehängt wurde, erfolgte die zweite Variante der Ligation. Der verwendete Vektor pGEM-T-Easy besitzt in der Region des Fragmenteinbaus einen „dTTP“-Überhang, so dass dort das cDNA-Fragment gezielt andocken kann. Zur Ligation wurden nun cDNA-Fragment und Vektor im Verhältnis 3:1 gemischt, wobei nicht mehr als 1 µg DNA eingesetzt wurde. Dem Reaktionsansatz wurden weiterhin 1 x Ligationspuffer und 3 U der T4-DNA-Ligase zugesetzt und vermischt. Die Inkubation erfolgte bei 4°C für 12 -16 h.

3.11.3 Transformation

E.coli DH5α subcloning efficiency Zellen von Invitrogen
LB-Medium (Luria Bertiani Medium, autoklaviert)

10 g Bacto-Trypton
5 g Hefe-Extrakt
10 g NaCl
ad 1 l H₂O_{dd}

Ampicillin 50 mg/ml in H₂O_{dd}

Der erhaltene Vektor wurde für die notwendige mengenmäßige Vermehrung in *E.coli*-Bakterien transformiert. Hierfür wurden 2 µl vom Ligationsansatz in 25 µl kompetente Zellen eingebracht, leicht gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für ca. 60 s und Abkühlung auf Eis folgte die Zugabe von 500 µl 1 x Luria-Bertani-Medium (LB-Medium). Anschließend wurden die Bakterien 1,5 h bei 37°C und 150 U/min geschüttelt und 200 µl auf eine Agarplatte ausplattiert, welche sowohl 0,05 % Ampicillin als auch IPTG (0,476 mg) und X-Gal (1,75 mg) enthielt. Durch die Einzelkoloniebildung konnte eine Blau-Weiß-Selektion erfolgen, wobei die das cDNA-Fragment enthaltenden Klone weiße Kolonien auf der Agarplatte bildeten und weiter verwendet wurden.

Zur Sequenzierung wurden die Proben an das Institut für Immunologie und Genetik Kaiserslautern Labor Dr. Thiele geschickt.

4. Ergebnisse

4.1 Isolierung von miRNAs mittels flashPage™-System

Der „flashPage™ Fractionator“ von Ambion ist eine Miniatur-Elektrophorese-Apparatur, die es ermöglicht, kleine einzelsträngige Nukleinsäuren beispielsweise aus Total-RNA-Präparationen, zu isolieren. Die Fraktionierung mittels Polyacrylamidgel führt zu einer zehntausendfachen Anreicherung der RNA-Population in den Größen zwischen 15 und 40 Nukleotiden. Somit ermöglicht diese Methode eine 80 % Ausbeute an miRNAs aus der gesamten RNA und enthält die für die Total-RNA repräsentative, relative Häufigkeit der isolierten miRNAs.

Mit Hilfe des flashPage™-Systems wurden miRNAs aus Zellen des TX3868 und dem Glioblastom H1300 mit Amplifikation der Chromosomenregion 12q13-21 angereichert. Mit den isolierten miRNAs wurden verschiedene Qualitätskontrollen durchgeführt:

Für die Größenkontrolle wurden die Fraktionen auf ein RNA-Gel aufgetragen. Wie Abbildung 4.1 zu entnehmen ist, waren die Banden der Fraktionen, ausgehend von einer Größe zwischen 15 und 40 Nukleotiden, entsprechend der vom Marker gesetzten Größenstandards unterhalb von 200 Basenpaaren zu finden.

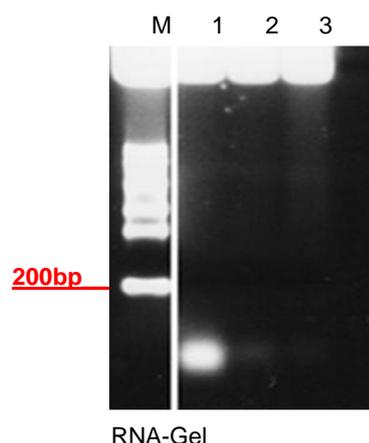


Abbildung 4.1: RNA-Gel zur Größenkontrolle der miRNA-Fraktionen des TX3868

M: Größenmarker RNA Ladder (New England Biolabs). **1:** Produkt der 40nt der Zelllinie des TX3868 aus dem flashPage™ Fractionator. **2:** Produkt der Fraktion über 40nt der Zelllinie des TX3868 aus dem flashPage™ Fractionator. **3:** Fraktion 2 der Zelllinie des TX3868 aus dem flashPage™ Fractionator.

Im Anschluss erfolgte die Konzentrationsbestimmung mit einer definierten RNA-Menge gegenüber der aufgetragenen miRNA-Fractionen auf einer Ethidiumbromid-Platte. Aus Abbildung 4.2 wird sichtbar, dass die miRNA-Konzentration auf ca. 150 ng geschätzt werden konnte.

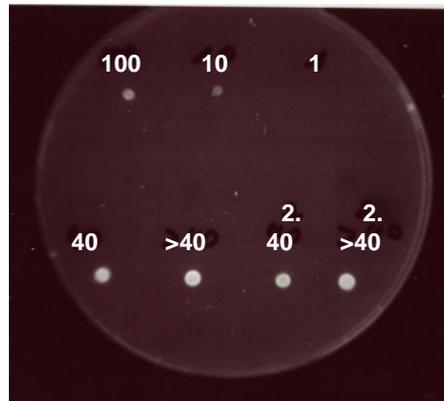


Abbildung 4.2: Ethidiumbromid-Platte zur Konzentrationsbestimmung der miRNA-Fractionen in den Zellen des TX3868 und dem Glioblastom H1300

Der Nachweis der miRNA-Konzentration erfolgte durch das Auftragen verschiedener Verdünnungsreihen (100, 10, 1) definierter RNA-Mengen gegenüber den 40nt und >40nt miRNA-Fractionen des TX3868 und des H1300 auf einer Ethidiumbromid-Platte. Die miRNA Konzentration wurde auf ca. 150 ng geschätzt.

4.2 Nachweis ausgewählter miRNAs

Die erfolgreiche Isolierung von miRNAs aus den Glioblastomzellen sollte mittels PCR ausgewählter bekannter miRNAs bestätigt werden. Insgesamt wurden vier bekannte miRNAs auf ihre Expression in Glioblastomen untersucht. Drei dieser miRNAs, nämlich die hsa-miR-616, die hsa-miR-26a-2 und die hsa-miR-16-1, konnten mit den spezifischen Primern in den entsprechenden miRNA-Populationen der Glioblastome mittels PCR-Amplifikation nachgewiesen werden.

Dieses Kontrollexperiment soll die Qualität des Ausgangsmaterials sichern, was für die erfolgreiche Weiterführung der Experimente essentiell ist.

hsa-miR-616

Um zu überprüfen, ob die hsa-miR-616 unter den durch das flashPageTM-System angereicherten miRNAs aus den TX3868 Zellen nachzuweisen war, wurden die Proben als erstes in drei Reaktionsschritten durch das Global Amplification Kit[®] von System Biosciences in eine miRNA-spezifische cDNA umgeschrieben. Das Global Amplification Kit erlaubt die

gleichmäßige und reproduzierbare Amplifikation der in begrenzten Mengen vorhandenen RNA (siehe Material und Methodik 3.5.3).

Die cDNA des TX3868 wurde durch spezifische Forward- und Reverse-Primer (*hsa-miR-616 forward* und *hsa-miR-616 reverse*) in einer darauffolgenden PCR-Reaktion vermehrt und auf ein 3 % NuSieve-Agarose-Gel aufgetragen. Wie man in Abbildung 4.3 erkennen kann, konnte ein PCR-Produkt der erwarteten Größe von 66 Basenpaaren detektiert werden.

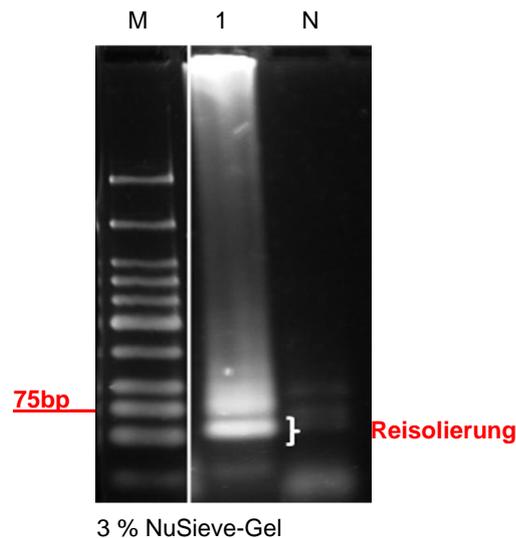


Abbildung 4.3: PCR-Produkt der Umschreibung des TX3868 für die hsa-miR-616

M: Größenmarker, Low Molecular Weight DNA Ladder (New England Biolabs). **1:** TX3868. **N:** Nullkontrolle. Das durch die spezifischen Forward- und Reverse-Primer entstandene Produkt der cDNA-Amplifizierung des TX3868 ist anhand dieses Bildes unterhalb der Markierung von 75 Basenpaaren, bei ca. 66 Basenpaaren, zu sehen.

Im nächsten Schritt wurde die DNA-Bande zwischen der Markierung von 50 und 75 Basenpaaren aus dem Gel mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen®) nach Protokoll isoliert und über Nacht gefällt. In der nachfolgenden PCR-Reaktion, in der das reisolierete Eluat mit den hsa-miR-616 spezifischen Forward- und Reverse-Primern (*hsa-miR-616 forward* und *hsa-miR-616 reverse*) amplifiziert wurde, zeigte sich erneut eine Bande unterhalb der 75 Basenpaare, wie in Abbildung 4.4 deutlich wird.

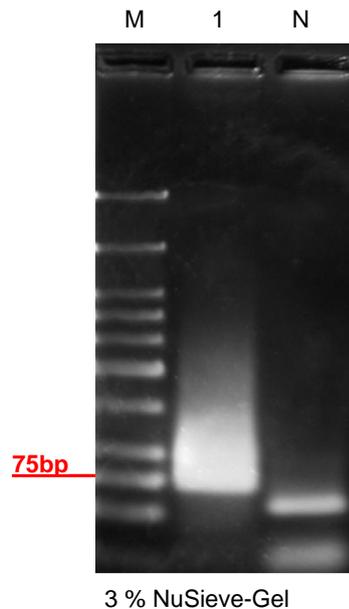


Abbildung 4.4: Nachweis der hsa-miR-616

M: Größenmarker, Low Molecular Weight DNA Ladder (New England Biolabs). **1:** TX3868. **N:** Nullkontrolle. Durch hsa-miR-616 spezifischen Forward- und Reverse-Primern wurde das reisolierte Eluat der Zellen des TX3868 mittels PCR vervielfältigt. Die entsprechende Bande des Produktes befindet sich unterhalb der Markierung der 75 Basenpaare.

Mit einer Sequenz von 22 Basenpaaren (AGUCAUUGGAGGGUUUGAGCAG) und den dazugehörigen Adaptorprimern, die eine Länge zwischen 32 oder 34 Basenpaaren besitzen, sollte das Produkt der hsa-miR-616 eine Länge von circa 66 Basenpaaren haben. Das Produkt entsprach ungefähr der erwarteten Größe.

hsa-miR-26a-2

Huse et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass die hsa-miR-26a-2 in humanen Gliomen überexprimiert und dass diese Überexpression den Prozess der malignen Transformation von Gliomen *in vivo* vereinfacht [31].

Für den Nachweis der hsa-miR-26a-2 in den Zellen des TX3868 wurde zunächst die isolierte miRNA-Fraktion in einer Denaturierungsreaktion durch Zugabe des hsa-miR-26a-2-Primer *rt6-hsa-miR-26a-2*, welcher 6 Basenpaare der hsa-miR-26a-2 bindet, auf eine Größe von 36 Basenpaaren verlängert. In der sich anschließenden RT-PCR-Reaktion wurde die miRNA-Probe in cDNA umgewandelt und mit Hilfe eines hsa-miR-26a-2-Primers (*short-miR-26a reverse*) und den spezifischen Adaptorprimern (*mp for*, *mp rev*) auf eine Größe von 83 Basenpaaren vervielfältigt.

Das Produkt wurde auf ein 3 % NuSieve-Agarose-Gel aufgetragen und konnte, wie aus Abbildung 4.5 ersichtlich, bei einer erwarteten Größe von 83 Basenpaaren detektiert werden.

Diese DNA-Bande wurde oberhalb der 75 Basenpaare aus dem Gel mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen®) nach Protokoll isoliert.

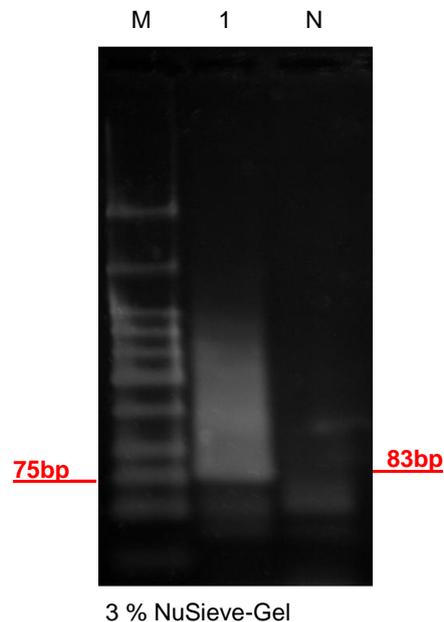


Abbildung 4.5: PCR-Produkt für die hsa-miR-26a-2 in TX3868

M: Größenmarker, Low Molecular Weight DNA Ladder (New England Biolabs). **1:** TX3868. **N:** Nullkontrolle.

Das durch die erste PCR-Amplifikation entstandene Produkt nimmt eine Größe von 83 Basenpaaren ein.

Es folgte eine Fällung des Eluats, welches anschließend aufgereinigt in einer erneuten PCR-Reaktion mit den hsa-miR-26a-2 spezifischen Forward- und Reverse-Primern (*hsa-miR-26a-2 forward* und *hsa-miR-26a-2 reverse*) amplifiziert wurde.

Da sich das zu erwartende Produkt aus dem hsa-miR-16-1-Forward-Primer mit einer Länge von 34 Basenpaaren und dem hsa-miR-16-1-Reverse-Primer mit einer Basenpaarlänge von 32 zusammensetzt, resultiert eine Gesamtlänge von 66 Basenpaaren.

In dem reisolierten Eluat, welches zuvor mit hsa-miR-26a-2 spezifischen Primern amplifiziert wurde, konnte das erwartete Produkt in der Bande unterhalb der Markierung von 75 Basenpaaren nachgewiesen werden. Mit Abbildung 4.6 wird durch den Nachweis des PCR-Produkts mit erwarteter Größe von 66 Basenpaaren das Vorhandensein der hsa-miR-26a-2 bestätigt.

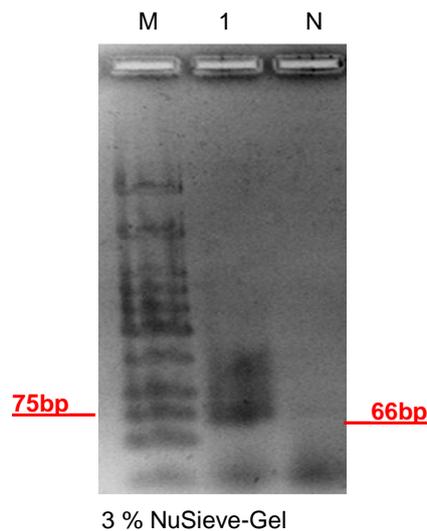


Abbildung 4.6: Bestätigung des Nachweises der hsa-miR-26a-2

M: Größenmarker, Low Molecular Weight DNA Ladder (New England Biolabs). **1:** TX3868. **N:** Nullkontrolle. Das 3 % NuSieve-Agarose-Gel zeigt das isolierte Eluat der Zellen des TX3868, welches zuvor mittels hsa-miR-26a-2 spezifischen Forward- und Reverse-Primern durch PCR amplifiziert wurde. Das PCR-Produkt befindet sich auf Höhe von 66 Basenpaaren.

hsa-miR-16-1

Die hsa-miR-16-1 kommt ubiquitär in vielen Zelltypen vor. Damit eine Aussage über das Vorhandensein der hsa-miR-16-1 getroffen werden konnte, wurden mit Hilfe des flashPageTM-Systems miRNAs aus Zellen des TX3868, aus dem Glioblastom H1300, aus Leukozyten und aus HeLa-Zellen angereichert.

Nachfolgende Reaktionen verliefen analog des Nachweises der hsa-miR26a-2. In der ersten Denaturierungsreaktion wurde den miRNA-Proben zunächst der hsa-miR-16-1-Primer *rt6-hsa-miR-16-1* hinzugegeben, der 6 Basenpaare der hsa-miR-16-1 bindet und sie somit zum jetzigen Zeitpunkt eine Größe von 36 Basenpaaren hat. Im weiteren Verlauf wurde die miRNA durch eine RT-PCR-Reaktion in cDNA umgeschrieben, über Nacht gefällt und anschließend in einer PCR-Reaktion mit Hilfe eines hsa-miR-16-1-Primers (*short-miR-16-1 reverse*) und den spezifischen Adaptorprimern (*mp for*, *mp rev*) vervielfältigt.

Der *short-miR-16-1 reverse*-Primer bindet an 16 Basenpaaren, sodass die miRNA eine Größe von 47 Basenpaaren hat und mit Amplifikation durch die spezifischen Adaptorprimer eine Länge von 83 Basenpaaren einnimmt.

In Abbildung 4.7 ist nur in den Zellen des TX3868 ein Produkt von der zu erwartenden Länge von 83 Basenpaaren auf dem Gel zu sehen, welches zur Bestätigung mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen[®]) nach Protokoll isoliert wurde.

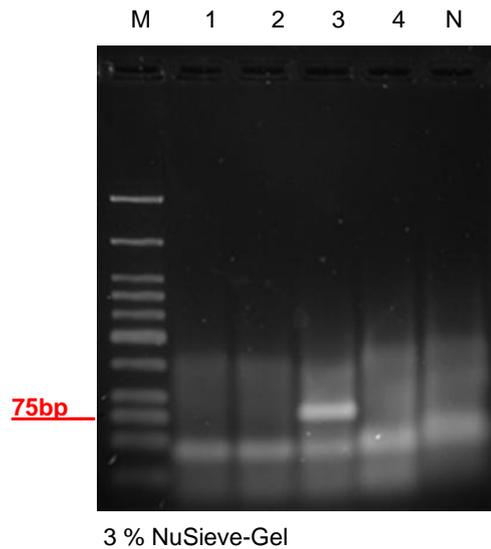


Abbildung 4.7: PCR-Nachweis der hsa-miR-16-1

M: Größenmarker, Low Molecular Weight DNA Ladder (New England Biolabs). **1:** HeLa-Zellen. **2:** Leukozyten. **3:** TX3868. **4:** H1300. **N:** Nullkontrolle. Nachweis der miRNA-spezifischen cDNA in HeLa-Zellen, in Leukozyten, in den Zellen des TX3868 und in dem Glioblastom H1300, die zuvor durch einen hsa-miR-16-1-Primer und den spezifischen Adaptorprimern vervielfältigt wurden. Eine hsa-miR-16-1 spezifische cDNA konnte nur als Produkt in den Zellen des TX3868 nachgewiesen werden.

Nach der Fällung und Aufreinigung des Eluats erfolgte eine erneute PCR-Reaktion. Diesmal jedoch mit den hsa-miR-16-1 spezifischen Forward- und Reverse-Primern (*hsa-miR-16-1 forward* und *hsa-miR-16-1 reverse*). Auf das Gel wurde zusätzlich zu dem PCR-Produkt als Kontrolle noch das aufgereinigte Eluat ohne Amplifikation aufgetragen, welches nach Abbildung 4.8 eine Größe von 83 Basenpaaren einnimmt. Ferner ist dieser Abbildung zu entnehmen, dass das zu erwartende Produkt der hsa-miR-16-1 spezifischen PCR-Reaktion bei einer Länge von 66 Basenpaaren detektiert und somit der Beweis für ihr Vorhandensein gebracht werden konnte.

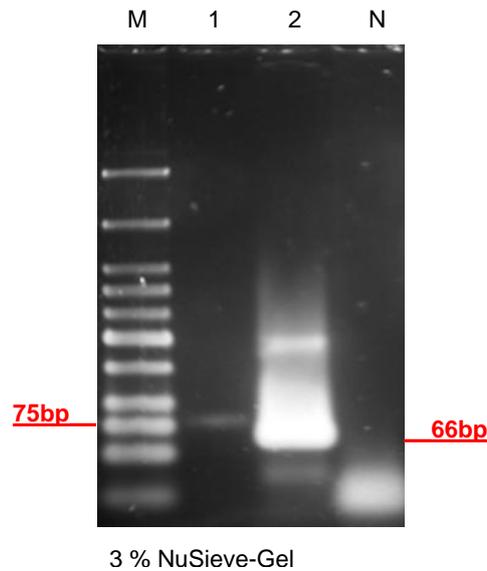


Abbildung 4.8: Bestätigung der hsa-miR-16-1 in TX3868

M: Größenmarker, Low Molecular Weight DNA Ladder (New England Biolabs). **1:** TX3868, Eluat 1. PCR-Produkt. **2:** TX3868, 2. PCR-Produkt. **N:** Nullkontrolle. Nachweis des hsa-miR-16-1 PCR-Produktes der Länge von 66 Basenpaaren mit den spezifischen Forward- und Reverse-Primern (Bahn 2). Als Kontrolle dient das reisolierte 83 Basenpaare große PCR-Produkt, das aus der ersten PCR-Umschreibung gewonnen wurde (Bahn 1).

In einem zweiten Versuchsansatz wurde die miRNA-Fraktion der HeLa-Zellen unter den gleichen Bedingungen umgeschrieben und amplifiziert. Aus den Produkten dieser Reaktion, welche in Abbildung 4.9 dargestellt sind, wurden die Banden auf Höhe der 50, 50 bis 75 und 75 bis 100 Basenpaaren isoliert.

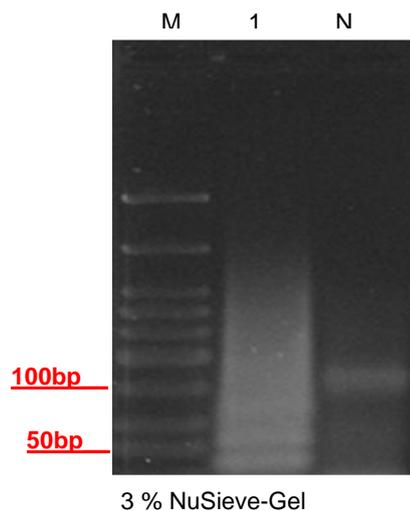


Abbildung 4.9: PCR-Nachweis der hsa-miR-16-1 in HeLa- Zellen

M: Größenmarker, Low Molecular Weight DNA Ladder (New England Biolabs). **1:** HeLa-Zellen. **N:** Nullkontrolle. Nachweis der miRNA-spezifischen cDNA in HeLa-Zellen, die mittels PCR-Reaktion durch einen hsa-miR-16-1-Primer und den spezifischen Adaptorprimern amplifiziert wurden. Die Banden auf Höhe der 50, 50 bis 75 und 75 bis 100 Basenpaaren wurden reisoliert.

Auch diese Eluate wurden in der darauffolgenden PCR-Reaktion mit den hsa-miR-16-1 spezifischen Forward- und Reverse-Primern vervielfältigt. Es wurde nur ein Produkt der HeLa-Fraktion der 50 Basenpaare in Abbildung 4.10 sichtbar und somit konnte die hsa-miR-16-1 in dieser Bande nachgewiesen werden.

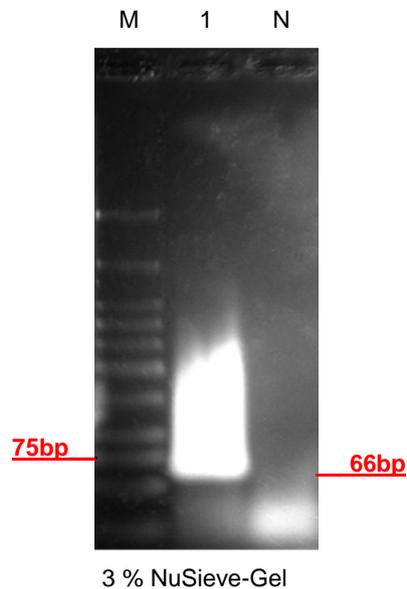


Abbildung 4.10: Bestätigung der hsa-miR-16-1 in HeLa-Zellen

M: Größenmarker, Low Molecular Weight DNA Ladder (New England Biolabs). **1:** HeLa, Bande 50 bp. **N:** Nullkontrolle. Das Eluat der HeLa-Zellen wurde mit den hsa-miR-16-1 spezifischen Forward- und Reverse-Primern amplifiziert. Nur das Produkt der HeLa-Fraktion von 50 Basenpaaren ist hier auf Höhe der 66 Basenpaare sichtbar.

Das zu erwartende Produkt setzt sich zusammen aus dem hsa-miR-16-1 Forward-Primer mit einer Länge von 34 und dem hsa-miR-16-1 Reverse-Primer mit einer Länge von 32 Basenpaaren. Daraus resultiert eine Gesamtlänge von 66 Basenpaaren.

Da diese Bande sowohl in den Zellen des TX3868 als auch in den HeLa-Zellen nachgewiesen wurden, spricht dies für das Vorhandensein der hsa-miR-16-1 in den entsprechenden Zelllinien.

In einem letzten Versuchsansatz wurden die miRNA-Fractionen des TX3868 und des Glioblastoms H1300 durch das Global Amplification Kit[®] von System Biosciences in eine miRNA-spezifische cDNA umgeschrieben und anschließend mit hsa-miR-16-1 spezifischen Forward- und Reverse-Primern vervielfältigt.

Das zu erwartende Produkt mit einer Gesamtlänge von 66 Basenpaaren konnte sowohl in den miRNA-Fractionen des TX3868 als auch des Glioblastoms H1300 in Abbildung 4.11 gezeigt werden.

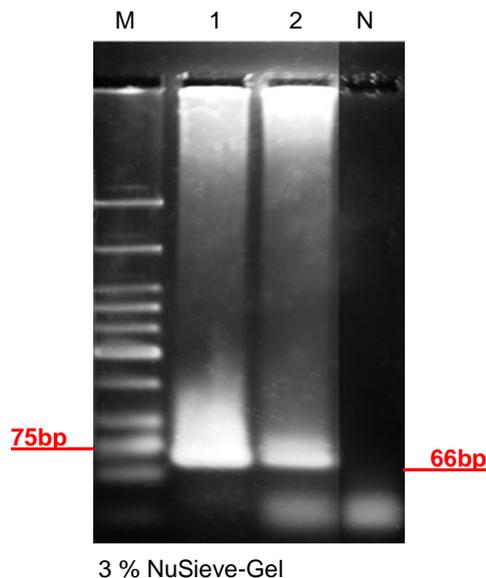


Abbildung 4.11: Nachweis der hsa-miR-16-1 in den Zellen des TX3868 und dem Glioblastom H1300

M: Größenmarker, Low Molecular Weight DNA Ladder (New England Biolabs). **1:** TX3868. **2:** H1300. **N:** Nullkontrolle. Die miRNA-Fractionen des TX3868 und des Glioblastoms H1300, welche per Global Amplification Kit® in eine miRNA-spezifische cDNA umgeschrieben wurden, wurden mit hsa-miR-16-1 spezifischen Forward- und Reverse-Primern vermehrt. In beiden Zellen ist eine Bande auf Höhe von 66 Basenpaaren sichtbar.

hsa-miR-21

Die hsa-miR-21 konnte als eine der ersten hochregulierten miRNAs in Glioblastomen identifiziert werden und man schreibt ihr eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Glioblastome und anderer Krebstypen zu [18]. Eine Überexpression dieser miRNAs wurde auch in anderen histologischen Krebsarten, wie zum Beispiel Brust-, Lunge-, Kolon-, Prostata-, Pankreas- und Magenkrebs nachgewiesen [80].

Um zu überprüfen, ob die hsa-miR-21 unter den durch das flashPage™-System angereicherten miRNAs aus den TX3868 Zellen, dem Glioblastom 1300, HeLa-Zellen und Leukozyten nachzuweisen war, wurden die Proben als Erstes denaturiert. Durch Zugabe des hsa-miR-21-Primers *rt6-hsa-miR-21* wurden die ersten 6 Basenpaare gebunden, womit die miRNA eine Größe von 36 Basenpaaren besitzt. Als Zweites folgte eine RT-PCR-Reaktion, in der die Proben in cDNA umgeschrieben, über Nacht gefällt und danach in einer PCR-Reaktion mit Hilfe eines hsa-miR-21-Primers (*short-miR-21 reverse*) und den spezifischen Adaptorprimern (*mp for*, *mp rev*) auf eine Größe von 83 Basenpaaren vervielfältigt wurden.

Der Abbildung 4.12 ist zu entnehmen, dass nur in den Zellen des TX3868 und dem Glioblastom H1300 ein Produkt mit den hsa-miR-21-Primern nachgewiesen werden konnte, da nur hier eine Bande auf Höhe von 83 Basenpaaren sichtbar war.

Eine weitere PCR mit den hsa-miR-21 spezifischen Primern wurde nicht mehr durchgeführt.

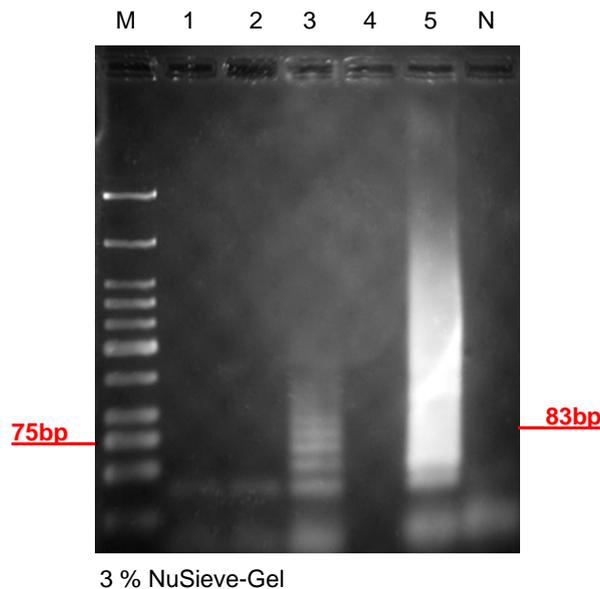


Abbildung 4.12: Nachweise der hsa-miR-21 in TX3868

M: Größenmarker, Low Molecular Weight DNA Ladder (New England Biolabs). **1:** HeLa-Zellen. **2:** Leukozyten. **3:** TX3868. **4:** frei. **5:** H1300. **N:** Nullkontrolle. Anhand der Band, die ca. auf Höhe von 83 Basenpaaren liegt, also oberhalb der Markierung von 75 Basenpaaren, konnte die hsa-miR-21 nur in den Zellen des TX3868 und Glioblastom H1300 nachgewiesen werden.

Der Nachweis aller dieser bereits bekannten miRNAs in den entsprechenden miRNA Populationen der Zellen des TX3868 mittels miRNA spezifischer PCR-Amplifikation bestätigte die Qualität des Ausgangsmaterials.

Somit konnte als Ergebnis dieser Kontrollexperimente eine durch PCR amplifizierbare miRNA-cDNA Bank aufgebaut werden, welche für die nachfolgenden Hybridisierungsreaktionen essentiell war.

4.3 Hybridisierung der miRNAs gegen BAC-Array 12q13-21

Die Methode der Microarray-basierten komparativen genomischen Hybridisierung (Array-CGH oder Matrix-CGH) wurde 1997 von Solinas-Toldo et al. am DKFZ in Heidelberg entwickelt. Die Array-CGH ist eine Weiterentwicklung der vergleichenden Genomhybridisierung (konventionelle CGH) und ermöglicht den Nachweis von Verlusten und Gewinnen an der genomischen DNA. Da man bei der Array-CGH für die Hybridisierung keine Chromosomen sondern DNA-Microarrays verwendet, kann für jede amplifizierte oder deletierte Region sofort die DNA-Sequenz bestimmt werden und nicht nur der Bereich einer chromosomalen Bande.

In einer umfangreichen Analyse der Amplifikation der Chromosomenregion 12q13-21 in menschlichen Gliomen konnten mit Hilfe von BAC-Array Untersuchungen verschiedene Subregionen identifiziert werden, die häufig in Gliomen amplifiziert sind [25].

Ob miRNAs im genomisch amplifizierten Bereich der Chromosomenregion 12q13-21 vorkommen, soll mit vorliegender Doktorarbeit anhand der Zellen des TX3868 mittels Array-miRNA-Hybridisierung genauer untersucht werden.

Zunächst wurden die Zellen des TX3868 durch das Global Amplification Kit[®] (System Biosciences) in eine durch PCR amplifizierbare cDNA Bank umgeschrieben, die in einer zweiten PCR mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Nukleotid (Cyanine-5-dCTP) markiert wurde. Diese so markierte miRNA-cDNA der Zellen des TX3868 wurde anschließend gegen einen speziell konstruierten Glas-Microarray hybridisiert. Einen Überblick über das Ergebnis der Hybridisierung des 12q13-21 Arrays gegen markierte miRNA-cDNA der Zellen des TX3868 zeigt Abbildung 4.13 A.

Auf diesem Array wurden zuvor maschinell 88 durch DOP-PCR amplifizierte künstliche Bakterienchromosomen (Bacterial Artificial Chromosomes, BACs) bzw. Cosmide in dreifacher Ausführung (drei Subarrays) nach dem Schema in Tabelle A.1.1 (siehe Anhang A.1) aufgespottet. Diese BAC-Klone entsprechen menschlichen genomischen Sequenzen vom Chromosom 12q13-21.

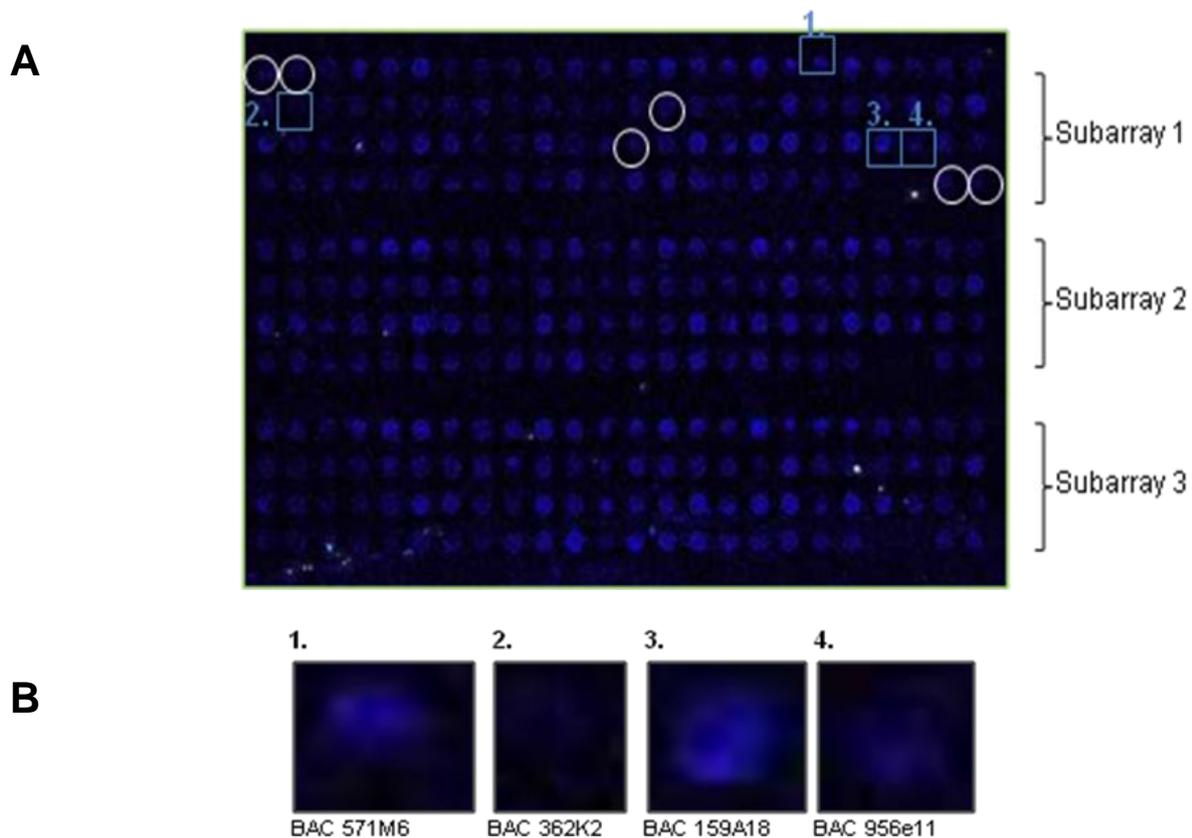


Abbildung 4.13: 12q13-21 Array-miRNA-Hybridisierung der Zellen des TX3868

 = ausgewählte BACs  = genomische Kontroll-DNA PB1-PB6

Abbildung 4.13 A: Ergebnis der Array-miRNA-Hybridisierung

Abbildung 4.13 B: Ausschnittsvergrößerung einzelner Array-miRNA-Hybridisierungen gegen

1. BAC 571M6, 2. BAC 362K2, 3. BAC 159A18, 4. BAC 965e11

Nach der Hybridisierung wurden die Arrays mit Hilfe des Express Microarray Scanner (PerkinElmer) eingescannt und durch die dazugehörige Bildanalysesoftware (ScanArray Express Microarray, Acquisition and Analysis Software, Version 2.0, PerkinElmer) in Rohdaten umgewandelt. Automatisch wurden daraufhin Intensitätswerte berechnet und tabellarisch ausgegeben. Von den drei Subarrays wurde jeweils der Mittelwert der Fluoreszenz-Intensitäten \bar{x} und die Standardabweichung s berechnet (siehe Material und Methodik 3.9.4). Dieser errechnete Mittelwerte \bar{x} der Fluoreszenz-Intensitäten wurden dann gegen Kontrollspots mit genomischer DNA normalisiert. Diese Kontrollspots PB1-PB6 sind durch eine weiße Umrandung in Abbildung 4.13 A hervorgehoben. Die normalisierten Mittelwerte sowie die Standardabweichung für jeden Array sind in Tabelle A.1.2 im Anhang dargestellt.

Die BAC-Proben, an die Cyanine-5 markierte miRNA entsprechende cDNA gebunden hat, wurden anhand deren Mittelwert der Fluoreszenz-Intensitäten, der mindestens drei Mal größer als die Standardabweichung war, identifiziert. Einige der nach diesen Kriterien ausgewählten in Frage kommenden BAC-Proben sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Eine BAC-Probe mit einem negativen Mittelwert diente im weiteren Verlauf als Negativkontrolle. In Abbildung 4.13 B sind all diese BACs durch Vergrößerung dargestellt.

Tabelle 4.1: Ergebnisse der quantifizierten Array-miRNA-Hybridisierung

1.TX3868 nach Standard-Hybridisierungsbedingungen. Dargestellt sind die gegen den genomischen Spot normalisierten Mittelwerte der Fluoreszenz-Intensitäten ausgewählter BACs und die Standardabweichung s

Spot	BAC-Probe/Name	1.TX3868
19	571M6	504
26	362K2	- 348
68	159A18	747
69	956e11	584
	s	131

Durch Veränderung der Waschbedingungen, d.h. Erhöhen der Temperatur und Absinken der Salzkonzentration, wurde ein zweiter Glas-Microarray mit einer höheren Stringenz angefertigt. Nach Hybridisierung unter veränderten Bedingungen wurde dieser Array eingescannt und nach dem Schema des ersten Arrays ausgewertet. Diese normalisierten Mittelwerte der Fluoreszenz-Intensität sowie die Standardabweichung für jeden Array sind im Anhang in Tabelle A.1.2 dargestellt. Auch hier sind in Abbildung 4.14 B sowohl die Kontrollspots PB1-PB6 als auch die ausgewählten BAC-Proben hervorgehoben.

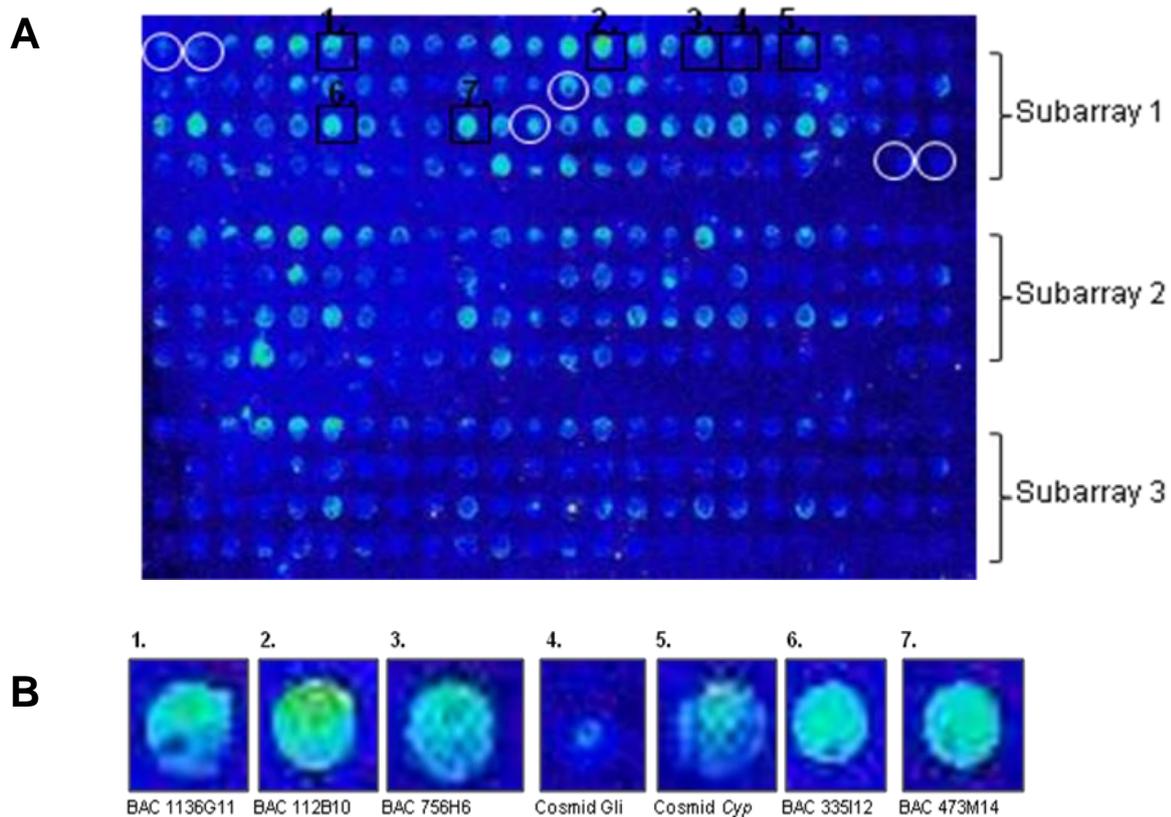


Abbildung 4.14: 12q13-21 Array-miRNA-Hybridisierung der Zellen des TX3868 nach veränderten Hybridisierungsbedingungen

□ = ausgewählte BACs ○ = genomische Kontroll-DNA PB1-PB6

Abbildung 4.14 A: Ergebnis der Array-miRNA-Hybridisierung nach veränderten Waschbedingungen

Abbildung 4.14 B: Ausschnittsvergrößerung einzelner Array-miRNA-Hybridisierungen nach veränderten Waschbedingungen gegen 1. BAC 1136G11, 2. BAC 112B10, 3. BAC 756H6, 4. Cosmid Gli, 5. Cosmid Cyp, 6. BAC 335I12, 7. BAC 473M14

In Tabelle 4.2 sind einige ausgewählte BAC-Proben zusammengefasst, deren Mittelwert der Fluoreszenz-Intensitäten nach der Hybridisierung mindestens drei Mal größer als die Standardabweichung war. Wie zu erkennen ist, sind die Mittelwerte der identifizierten BAC-Proben, an die Cyanine-5 markierte miRNA entsprechende cDNA gebunden hat, deutlich größer nach den stringenteren Waschbedingungen. Auch hier diente eine BAC-Probe mit einem negativen Mittelwert im weiteren Verlauf als Negativkontrolle. In Abbildung 4.14 B sind all diese BACs durch Vergrößerung dargestellt.

Tabelle 4.2: Ergebnisse der quantifizierten Array-miRNA-Hybridisierung

2.TX3868 nach veränderten Hybridisierungsbedingungen. Dargestellt sind die gegen den genomischen Spot normalisierten Mittelwerte der Fluoreszenz-Intensitäten ausgewählter BACs und die Standardabweichung *s*

Spot	BAC-Probe/Name	2.TX3868
6	1136G11	4492
14	112B10	5883
17	756H6	5162
18	Gli	-1655
20	<i>Cyp</i>	1651
54	335I12	7036
58	473M14	7490
	<i>s</i>	1453

Der sehr stark abweichende Wert für Gli muss aus der Auswertung ausgeschlossen werden, da es sich hierbei um eine sehr schwache Bindung nach der Hybridisierung handelt.

4.4 Reisolierung der gebundenen miRNAs

Diese durch die Hybridisierungsreaktion des 12q13-21 Arrays gegen markierte miRNA-cDNA der Zellen des TX3868 identifizierten Spots mit starker Fluoreszenz-Intensität sind ein Indiz für gebundene, vielleicht auch noch unbekannte miRNAs. Um für weitere Experimente zur Verfügung zu stehen, sollten diese reisoliert werden.

Da ein Abwaschen von dem Glas-Array jedoch nicht möglich war, wurden die anhand Tabelle 4.1 ausgewählten BACs, die eine potentielle miRNA-Hybridisierung zeigten, auf eine Nylonmembran transferiert und anschließend anhand der gleichen Bedingungen wie für den Array in Abbildung 4.13 gegen Cyanine-5-dCTP gekoppelte miRNA-cDNA der Zellen des TX3868 hybridisiert. Das Ergebnis dieser Hybridisierung ist in Abbildung 4.15 dargestellt. Die Detektion der Fluoreszenz der gebundenen Sonde erfolgte mit dem *Typhoon* Scanner (GE Healthcare). Die Signale wurden computergesteuert bei einer Auflösung von 50 µm und einer PMT-Einstellung von 300 detektiert und aufgezeichnet.

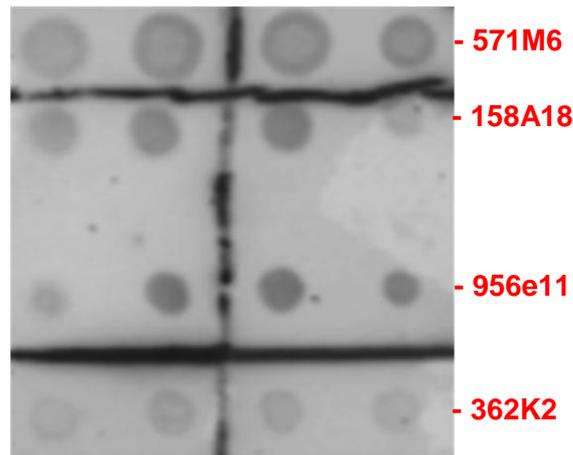


Abbildung 4.15: Membranhybridisierung der identifizierten BACs gegen Cy5-miRNA-cDNA des TX3868

Die ausgewählten BACs wurden jeweils vier Mal auf einer 4cm x 4cm langen Nylonmembran fixiert und anschließend gegen miRNA-cDNA hybridisiert. Diese Anordnung diente zur Verifizierung, wo die Bindung am stärksten nachzuweisen ist, dh. ob Innen oder Außen.

Nachdem die entsprechenden BAC-Klone 159A18 und 956e11 identifiziert waren, wurden sie ausgeschnitten und durch Denaturierung reisoliert, um für Klonierungs- und nachfolgende Sequenzierungsvorgänge zur Verfügung zu stehen.

Die reisolierten Dots wurden zunächst in einer PCR-Reaktion mit adapterspezifischen Primern (*miRNA forward*, *miRNA reverse*) aus dem Global Amplification Kit[®] von System Biosciences amplifiziert. Wie in Abbildung 4.16 zu sehen, konnten in dem BAC 159A18 und 956e11 zahlreiche PCR-Produkte in der erwartenden Größe von 100 bis 150 Basenpaaren ausfindig gemacht werden.

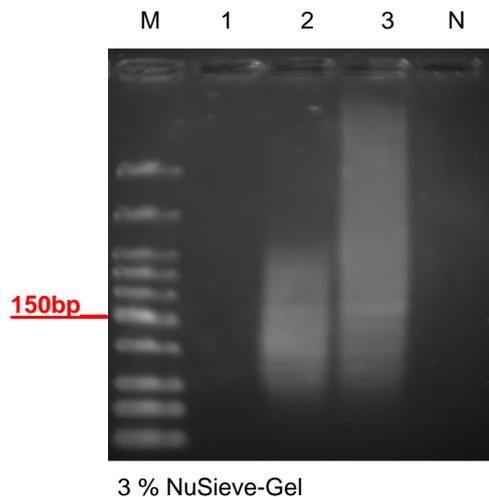


Abbildung 4.16: Reamplifikation der gebundenen miRNAs

M: Größenmarker, Low Molecular Weight DNA Ladder (New England Biolabs). **1:** frei. **2:** 159A18. **3:** 956e11. **N:** Nullkontrolle. Die reisolieren Produkte der Membranhybridisierung wurden in einer PCR-Reaktion mit miRNA adapterspezifischen Primern amplifiziert. In den BACs 159A18 und 956e11 sind in der Größe 100 bis 150 Basenpaaren zahlreiche PCR-Produkte zu erkennen.

Für die Klonierung wurden der Vektor pGEM-T-Easy und *E.coli*-Bakterien als Wirt genutzt (siehe Material und Methodik 3.11). Die ligierten Plasmide wurden in Bakterienkulturen transformiert, amplifiziert und unter Verwendung des Qiagen® Plasmid Miniprep Kits aufgereinigt. Bei der Sequenzierung konnten in vier der 15 Klone von 159A18 eine intakte Sequenz identifiziert werden, welche Strukturen der hsa-miR-1826 und dessen Precursor enthielten. In vier der 15 Klone des 956e11 konnten Sequenzen der Homo sapiens 28S ribosomalen RNA sequenziert werden (Sequenzen siehe Anhang A.3.1, A.3.2).

Da diese Ergebnisse unspezifisch waren, wurden in folgenden Versuchsansätzen die stringenteren Hybridisierungsbedingungen des miRNA Hybridisierungs-Arrays in Abbildung 4.14 übernommen.

Es wurden in dem darauffolgendem Versuchsansatz die BACs mit hybridisierter miRNA ausgewählt, die in der Tabelle 4.2 aufgeführt sind. Sie wurden auf einer Nylonmembran fixiert und anschließend anhand der gleichen Bedingungen für den Array in Abbildung 4.14 gegen Cyanine-5-dCTP gekoppelte miRNA-cDNA der Zellen des TX3868 hybridisiert. Das Ergebnis nach veränderten Hybridisierungsbedingungen ist in Abbildung 4.17 dargestellt. Die Detektion der Fluoreszenz der gebundenen Sonde und die Auswertung der Signale erfolgten nach bekanntem Schema.

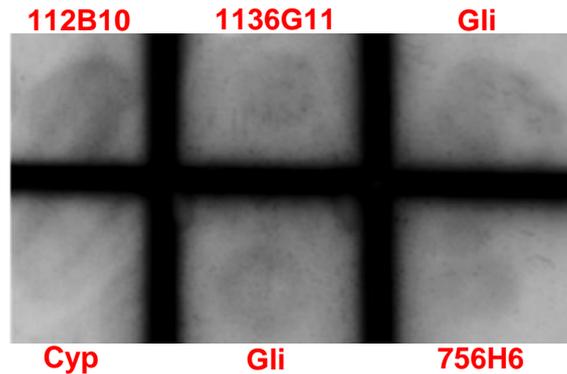


Abbildung 4.17: Membranhybridisierung der identifizierten BACs gegen Cy5-miRNA-cDNA des TX3868 nach veränderten Hybridisierungsbedingungen

Die ausgewählten BACs wurden jeweils ein Mal auf einer 2cm x 2cm langen Nylonmembran fixiert und anschließend gegen miRNAs hybridisiert.

Durch denaturierende Reisolierung wurden die erkannten BACs diesmal ohne PCR-Amplifikation für den nachfolgenden Klonierungs- und Sequenzierungsvorgang eingesetzt. Da nur von drei BACs (112B10, 1136G11 und 756H6) cDNA-Fragmente einligiert werden konnten, wurde nur deren Plasmid-DNA unter Verwendung des Qiagen® Plasmid Miniprep Kits isoliert und für eine Sequenzierung eingesetzt.

Bei der Sequenzierung konnte in keinen Klonen eine intakte Sequenz identifiziert werden, sodass davon auszugehen war, dass die Inserts fehlerhaft und zu klein waren.

Durch eine Erhöhung der Hybridisierungstemperatur wurde eine zweite, stringenter Membran angefertigt, wie sie in Abbildung 4.18 zu sehen ist, auf der auch die Konzentration der aufgetragenen identifizierten BACs mit hybridisierter miRNA verdoppelt wurde.

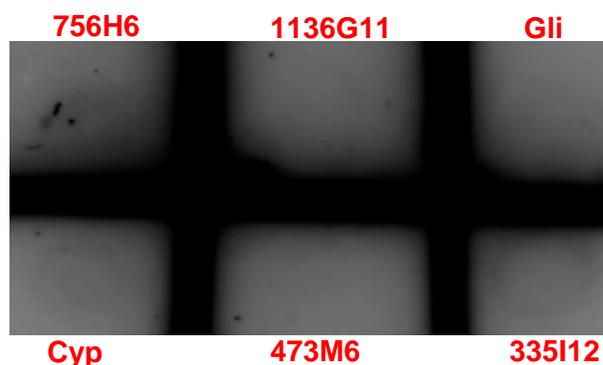


Abbildung 4.18: Membranhybridisierung der identifizierten BACs gegen Cy5-miRNA-cDNA des TX3868

Die ausgewählten BACs wurden jeweils ein Mal auf einer 2cm x 2cm langen Nylonmembran fixiert und anschließend gegen miRNAs hybridisiert.

Die reisolieren Dots wurden diesmal anhand einer PCR-Reaktion mit adapterspezifischen Primern (*miRNA forward*, *miRNA reverse*) aus dem Global Amplification Kit[®] von System Biosciences nach Protokoll amplifiziert. Auf Grund der sehr kleinen Größe und Heterogenität der miRNAs (19-24 Nukleotide) kann die Größe der miRNA-amplifizierten Spezies zusammen mit den 60 Nukleotid großen Adaptoren eine Länge zwischen 79 und 84 Basenpaaren haben.

Auf Höhe der 75 Basenpaare sind in Abbildung 4.19 in dem amplifizierten BAC 756H6 PCR-Produkte vorhanden, die für das Vorhandensein von miRNA sprechen.

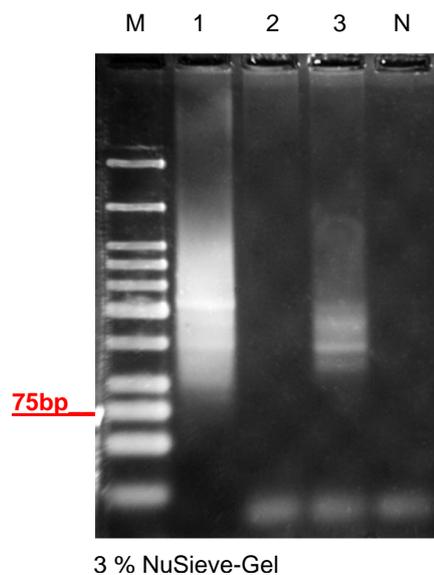


Abbildung 4.19: Amplifikation der gebundenen miRNAs

M: Größenmarker, Low Molecular Weight DNA Ladder (New England Biolabs). **1:** 756H6. **2:** 335112. **3:** 473M14. **N:** Nullkontrolle. Die reisolieren Produkte der Membranhybridisierung wurden in einer PCR-Reaktion mit miRNA adapterspezifischen Primern amplifiziert. In dem BAC 756H6 sind auf Höhe von 75 Basenpaaren PCR-Produkte zu erkennen.

Ob es sich in dem amplifizierten BAC 756H6 tatsächlich um die Anwesenheit einer miRNA handelt, muss in weiterführenden Klonierungs- und Sequenzierungsschritten geklärt werden. Somit konnte ein BAC mit potentiell hybridisierten miRNAs identifiziert werden, in dem Gene, jedoch keine bekannten miRNAs, vorhanden sind.

5. Diskussion

Bereits 1993 wurden die ersten miRNAs, *lin-4* und *let-7*, in *Caenorhabditis elegans* entdeckt, wo diese miRNAs entscheidende Entwicklungsprozesse beim Übergang zwischen Larvenstadien steuern [45, 74]. Jedoch konnten erst einige Jahre später in mehreren Veröffentlichungen die Anwesenheit von miRNAs in einer Reihe von eukaryotischen Organismen offenbaren und ihnen eine Schlüsselrolle im *silencing* von RNA-Transkripten zuschreiben [10, 29, 53, 54]. Da miRNAs die Translation negativ regulieren, vermindert sich das mRNA-Level bzw. die zugehörige Protein-Expression mit steigender miRNA-Expression. Zuerst konzentrierte man sich darauf neue miRNAs nachzuweisen, inzwischen liegt der Schwerpunkt der Forschung auf der Funktionalität. Seither wurden stetig neue Belege für die essentielle Rolle einiger miRNAs in der Entwicklung von Organismen und Organen, gefunden. Für das Herz, die Haut, das Lungenepithel, die Extremitäten und sowie das Gehirn bzw. die Neuronen konnte die vielfältige Bedeutung der miRNAs durch ihre Vernetzung und Möglichkeit zur Feinregulation der Proteinexpression gezeigt werden [84]. Zielgene der miRNAs sind häufig Gene, die in Verbindung mit der Onkogenese beschrieben werden [10].

Nach der miRBase Sequence Database, Release 14.0, einer Online-Datenbank für alle bereits publizierten MicroRNAs in Primaten, Nagetieren, Vögeln, Fischen, Würmern, Fliegen, Pflanzen und Viren (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) sind bis jetzt 488 Maus und 922 menschliche miRNAs beschrieben [2]. Etwa ein Drittel der menschlichen Gene soll in ihrer Expression von miRNAs beeinflusst werden [1, 46].

Mit relativ geringfügigen Ausnahmen wissen wir wenig über die exakte Rolle der großen Mehrheit der miRNAs in der Regulierung der Genexpression. Das umfassendste Forschungsgebiet bezüglich der Rolle von miRNAs in menschlichen Krankheiten beschäftigt sich mit der Entstehung von Tumoren, welche zum größten Teil durch die unkontrollierte Proliferation und das verlängerte Überleben beschädigter Zellen verursacht werden [5]. Zum ersten Mal wurde der Zusammenhang zwischen miRNA und Tumorerkrankungen für Lungenkrebs beschrieben. Takamizawa et al. konnten zeigen, dass eine verringerte *let-7*-Expression mit der schlechteren Überlebensrate bei Lungenkrebs korreliert [79]. Im Einzelnen können miRNAs als Tumorsuppressoren agieren, in dem sie die Expression der Tumorpromotor- oder die der Tumorsuppressorgene regulieren [9].

Die genomischen Abnormitäten, die miRNA-Funktionen in Tumoren beeinflussen, sind denjenigen ähnlich, die auch von protein-kodierenden Genen bei der Krebsentstehung bekannt sind. Hierbei handelt es sich beispielsweise um Genamplifikationen, Deletionen oder Punktmutationen [12]. Trotzdem ist für die wenigsten humanen miRNAs mehr als ihre eigentliche Existenz veröffentlicht.

Viele Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit der Identifikation tumorspezifischer miRNAs; ebenso sind die in der vorliegenden Arbeit differentiell exprimierten miRNAs meist in Zusammenhang mit Tumoren beschrieben. Es ist außerdem bekannt, dass miRNAs als Regulator in der Differenzierung der Zellen wirken können. In Säugetieren sind ca. 2 % alle Gene miRNA-Gene. Sie zeigen in verschiedenen Geweben verschiedene Expressionslevel. Ein weitreichendes Screening zahlreicher verschiedener humaner Zellen und Gewebe wurde 2007 von Landgraf et al. veröffentlicht. Im diesem Rahmen wurden mehrere der theoretisch vorhergesagten miRNAs tatsächlich detektiert [38].

In den letzten Jahren werden zunehmend epigenetische Modifikationen und Einflüsse der an der Genregulation beteiligten miRNAs für die Gliombiologie diskutiert [67]. In primären Gehirntumoren, im speziellen den Glioblastomen, konnten bereits mehrere miRNAs identifiziert werden, die ein unterschiedliches Expressionsmuster aufweisen [16].

5.1 Einfluss nachgewiesener miRNAs auf die Gliomgenese

Mit Hilfe des flashPageTM-Systems wurden angereicherte miRNAs aus Zellen des TX3868 und dem Glioblastom H1300 mit Amplifikation der Chromosomenregion 12q13-21 isoliert. In dieser Arbeit untersuchten wir miRNAs der Chromosomenregion 12q13-21 auf ihre Expression in Glioblastomen mit bekannter Amplifikation der selbigen Region. Dieses erfolgreiche Kontrollexperiment mittels miRNA spezifischen PCR-Amplifikationen führten wir durch, um zunächst diejenigen miRNAs zu identifizieren, die laut Literatur eine Rolle in der Tumorgenese des GBMs spielen. Auf der Suche nach neuen unbekanntem miRNA wurden nachfolgende Hybridisierungsexperimente durchgeführt.

In der Literatur findet sich sehr wenig über die Rolle der hsa-miR-616 in Bezug auf das Glioblastom, worin sich auch die Schwierigkeit der Aufklärung der genauen Funktion bestimmter miRNAs widerspiegelt. Es wird lediglich in einer Studie berichtet, dass diese miRNA die 14-bp Fragment-Region des HLA-G-Lokus zum Ziel hat, was auf eine bedeutende Rolle der miRNA bei HLA-G-Expressionsmuster schließen lässt [13].

Diese miRNA ist auf dem Chromosomenabschnitt 12q13.3 und somit in der Nähe des Genes Gli lokalisiert. Mit spezifischen Primern konnten wir die hsa-miR-616 mittels PCR-Amplifikation in den entsprechenden miRNA-Populationen in den Zellen des TX3868 nachweisen. Mit dem anschließenden Ergebnis des Hybridisierungsexperimentes konnten wir nicht bestätigen, dass die hsa-miR-616 auf einem Cosmid der Zellen des TX3869 lokalisiert ist, die das Gen Gli enthält. Ein Grund dafür könnte sein, dass man die Größe des

Cosmids Gli nicht abschätzen kann und somit der abgedeckte Bereich des Cosmids nicht mit der genauen Lokalisation der hsa-miR-616 übereinstimmt.

Auf 12q14.1 ist eine weitere bekannte miRNA lokalisiert, die hsa-miR-26a-2. Palmieri et al. beschreiben die erhöhte Expression der hsa-miR-26a im Zusammenhang mit der osteogenen Differenzierung [63]. Des Weiteren wurde SMAD1 als Zielgen der hsa-miR-26a identifiziert [50]. In der Veröffentlichung von Wong et al. wird die hsa-miR-26a als Regulator der Myogenese in Mauszellen beschrieben [83]. Huse et al. beschäftigten sich mit der Rolle der hsa-miR-26a in high-grade Gliomen und deren Einfluss auf die Gliomgenese [31]. Die Arbeitsgruppe ist zu dem Ergebnis gekommen, dass die hsa-miR-26a in high-grade Gliomen überexprimiert ist und PTEN als direktes Target hat. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass diese miRNA in high-grade Gliomen amplifiziert ist und ihre Überexpression mit dem monoallelischen Verlust des PTEN-Gens korreliert. Letzteres legt eine Unterdrückung des PTEN-Transkriptes durch Amplifikation nahe. Die Amplifikation der hsa-miR-26a auf dem Chromosom 12q ist der determinierende Faktor für die hsa-miR-26a Überexpression in GBM [39]. Im Allgemeinen sind Amplifikationen der hsa-miR-26a-2 auffallend häufig in solchen Tumoren vorhanden, in denen auch die hsa-miR-26a hoch reguliert war. Eine hsa-miR-26a Überexpression kommt somit durch eine erhöhte Kopienzahl auf dem genomischen Level zu Stande [31]. Die Analysen der hsa-miR-26a Amplifikationen in GBM wurden auf die TCGA (*The Cancer Genome Atlas*)-Datenbank ausgeweitet [39]. Hier sind die Ergebnisse des CGH-Array für die Genexpression und DNA-Methylierung von ca. 200 GBM-Proben hinterlegt. Durch Vergleich der Daten konnten die Ergebnisse der hsa-miR-26a-2 Amplifikation in 11 % der GBMs, die auch eine erhöhte hsa-miR-26a Expression haben, bestätigt werden. Zusätzlich fiel auf, dass die hsa-miR-26a-2 in allen Fällen mit einem bestimmten Gensatz coamplifiziert ist, inklusive des Onkoproteins CDK4 [8, 39]. Entsprechend der Literatur konnten wir durch primerspezifische PCR-Amplifikation den Nachweis der hsa-miR-26-a-2 in den Zellen des TX3868 erbringen und die Erkenntnisse von Huse et. al bestätigen.

Die hsa-miR-21 konnte als eine der am häufigsten in Profiling-Experimenten hochregulierten miRNAs identifiziert werden, welche für die Detektion von deregulierten miRNAs in humanen Krebsarten durchgeführt wurden [85]. Durch ihre stabile Rolle in der glialen kanzerösen Zelltransformation schreibt man ihr ebenfalls eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von Glioblastomen zu [15]. Das potentielle Vorkommen der hsa-miR-21 bestätigt unser PCR-Nachweis in den Zellen des TX3868 und in dem Glioblastom H1300, jedoch nicht in HeLa- und Leukozytenzellen. Ein spezifischer Nachweis wurde nicht weiter durchgeführt.

Eine progressions-assoziierte Hochregulation der hsa-miR-21 und hsa-miR-16-1 konnten Malzkorn et al. bei der Mehrzahl der an Hirntumoren erkrankten Patienten nachweisen [51].

Der hsa-miR-15a/16-1-Cluster, auf dem Genlokus 13q14 befindlich, ist in mehr als 65 % der chronisch lymphatischen B-Zell-Leukämie (CLL) Fälle, in 60 % der Prostata-Krebs-Fälle, in 16-40 % der multiplen Myelome und in 50 % der Mantel-Zellen-Lymphome (eine seltene Unterform des Non-Hodgkin Lymphoms) deletiert [10]. Vermutlich dereguliert dieser miRNAs-Cluster ein anti-apoptotisches Gen, das BCL2, das häufig in Leukämien und Lymphomen überexprimiert ist [10]. Anhand dieser miRNAs wird deutlich, dass ihr Einfluss durchaus von der Art des Krebs anhängig ist [43]. Die Herunterregulation des hsa-miR-15a/16-1-Clusters kann zu Krebs führen, andererseits wurde eine Hochregulation im pankreatischen Adenokarzinom beobachtet, was deutlich macht, dass man die miRNA-Funktion immer im zellulären Kontext betrachten muss [77]. MiRNAs, die während der Differenzierung vermindert exprimiert bzw. komplett abgeschaltet werden, können eine Rolle in der Selbsterneuerung von Stammzellen spielen. Dass diese miRNA in den unterschiedlichsten Zellen der Krebsarten vorkommt, konnten wir durch unsere Experimente bestätigen. Wir konnten die hsa-miR-16-1 in den HeLa-Zellen, in den TX3868-Zellen und dem Glioblastom H1300 durch eine miRNA spezifische PCR-Amplifikation mit hsa-miR-16-1 spezifischen Primern nachweisen.

Diese Untersuchungen legen somit nahe, dass wir mit der Methode der miRNA spezifischen PCR-Amplifikation die Expression von drei der vier untersuchten miRNAs nachweisen konnten. Drei dieser nachgewiesenen bekannten miRNAs zeigen ein charakteristisches Expressionsmuster in der Tumorgenese des GBMs. Damit war das Kontrollexperiment erfolgreich und die angereicherte miRNAs aus den Zellen des TX3868 konnten im zweiten Versuchsansatz genutzt werden, um der Frage nachzugehen, ob weitere miRNAs im genomisch amplifizierten Bereich der Chromosomenregion 12q13-21 vorkommen.

5.2 Bedeutung des Nachweises amplifizierter miRNAs

Eine essentielle Rolle am Entwicklungsprozess der Gliomgenese konnte für angeführten miRNAs belegt werden. Dagegen war bisher völlig unbekannt, ob und welche miRNAs in den genomisch amplifizierten Bereichen der Chromosomenregion 12q13-21 vorkommen, in denen keine bekannten Gene lokalisiert sind. Analysen bereits identifizierter miRNAs ergaben eine Korrelation der Lokalisation mit amplifizierten Chromosomenregionen [11]. Bisher ist nur wenig über die Bedeutung von miRNAs in amplifizierten Chromosomenregionen bekannt.

In unserer Arbeitsgruppe hat man sich schon intensiv mit der Funktion und Bedeutung einzelner amplifizierter Gene aus der Chromosomenregion 12q13-21 beschäftigt [25].

Der Amplifikationsstatus der BAC-Klone 58A17 (KUB3), 571M6 (CDK4), 611O2 (MDM2) und des Cosmid Klons CYP27B1 konnte bereits im Vorfeld durch Array-CGH Analysen der Chromosomenregion 12q13-21 in Glioblastomen nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte ein möglicher Einfluss dieser Genamplifikation auf die Überlebensrate von Glioblastompatienten gezeigt werden [22]. Tatsächlich nämlich indizieren die Untersuchungen, dass Patienten mit KUB3, CDK4 und/oder CYP27B1 Amplifikationen eine kürzere Überlebensdauer haben, als Patienten ohne diese Amplifikationen [22]. In der ENSEMBLE Human Genome Database sind in dieser Region allerdings wenige bekannte miRNAs beschrieben. Die Region 12q13.13 enthält die hsa-miR-196a-2, die hsa-miR-615 und die hsa-miR-148b. Auf dem Abschnitt 12q13.3 befindet sich die hsa-miR-1228 und die hsa-miR-616, 12q14.1 beinhaltet die hsa-miR-26a-2 und die hsa-miRlet-7i. Die Umgebung von 12q14.2 weist die hsa-miR-548c und die von 12q21.2 die hsa-miR-1252 auf. Der Bereich 12q21.3 schließt die hsa-miR-618 ein.

Die Identifizierung von Verlusten und Gewinnen auf genetischer Ebene ist in der Analyse von Glioblastomen sehr wertvoll. BAC-Array-Untersuchungen erlauben die Summe an genetischen Änderungen in nur einem einzelnen CGH-Experiment zu definieren. Diese CGH-Experimente erwiesen sich als sehr genau und effizient, um genetische Abweichungen in Glioblastomen zu identifizieren [20].

Ob neue miRNAs im genomisch amplifizierten Bereich der Chromosomenregion 12q13-21 vorkommen, untersuchten wir anhand der Zellen des TX3868 mittels einer Hybridisierungsreaktion gegen einen 12q13-21 Array. Der BAC-Array wurde so konstruiert, dass er unter anderem speziell die in verschiedenen Glioblastomen amplifizierten Regionen enthält. Ein Teil dieser BACs enthält keine bekannten Gensequenzen. Einige Beispiele für amplifizierte BACs ohne Gene, die in dem Abschnitt 12q14.1 liegen, sind BAC 777M, BAC 335M9, BAC 318E11, BAC 424B7, BAC 571A2 und BAC 597C7. Die BACs wurden auf einen Glasarray gespottet und gegen Cyanine 5-dCTP gekoppelte miRNA-cDNA der Zellen des TX3868 hybridisiert, welche zuvor mittels PCR in eine miRNA-cDNA Bank umgeschrieben wurde.

Unsere beiden ersten identifizierten BAC-Klone 159A18 und 956e11 zeigten in einer anschließenden PCR-Reaktion mit adapterspezifischen Primern zahlreiche Produkte in der erwarteten Größe von 100 bis 150 Basenpaaren.

In der nachfolgenden Sequenzierung konnten in den PCR-Produkten des BACs 159A18 die Sequenzen der hsa-miR-1826 und dessen Precursor identifiziert werden.

Die Sequenzen der Homo sapiens 28S ribosomalen RNA wurden in den PCR-Produkten des BACs 956e11 gefunden.

Die hsa-miR-1826 könnte auf Grund ihrer Überexpression in Kolonkarzinomzellen als Onkogen funktionieren [86]. Welche Rolle diese miRNA in Bezug auf das Glioblastom spielt, ist bis heute nicht klar.

Da diese Ergebnisse relativ unspezifisch waren und nicht zum Nachweis einer unbekannt miRNA dienen, führten wir stringendere Hybridisierungsbedingungen ein.

Jene in diesem Versuch identifizierten gebundenen DNA-Stücke der BAC-Klone 112B10, 1136G11 und 756H6 waren wegen deren fehlerhaften Inserts nicht sequenzierbar. Durch Erhöhung der Hybridisierungstemperatur, Verdopplung der Konzentration der aufgetragenen identifizierten BACs und einer anschließenden PCR-Reaktion der reisolierten Dots mit adapterspezifischen Primern, analog der ersten identifizierten BAC-Klone, wurde die Hybridisierungsreaktion erneut durchgeführt. In dem amplifizierten BAC 756H6 fielen auf Höhe der Markierung von 75 Basenpaaren PCR-Produkte auf, die für das Vorhandensein von miRNA sprechen. Laut der ENSEMBLE Human Genome Database sind in dieser Region, dem Abschnitt 12q13.3, protein-kodierende Gene und die Non-coding RNA (ncRNA) U6 vorzufinden, miRNAs sind bis jetzt nicht bekannt.

Es stellte sich die Frage, ob neue miRNAs überhaupt aus amplifizierten Regionen von TX3868 gefunden werden können. Die BAC-Klone 159A18, 956e11 und 756H6 waren im Gegensatz zu den BAC-Klonen 112B10 und 1136G11 amplifiziert. Alle enthielten jedoch bekannte Gene. Unsere „Gen-leeren“ BACs zeigten keine auffälligen Hybridisierungsergebnisse. Die Ursache dafür ist wahrscheinlich, dass keine Überexpression von miRNAs in den Zellen des TX3868 vorhanden ist, da eine Amplifikation der Chromosomenregion 12q14.1 von 60.3 bis 61.6 Mb fehlt.

Insgesamt lassen unsere Ergebnisse auf das Vorhandensein von miRNAs in dem amplifizierten BAC 756H6 schließen und werfen ein neues Licht auf die Entstehung von Glioblastomen, die zwar gut untersucht, aber bei weitem nicht ausreichend verstanden sind.

5.3 Ausblicke

Unsere Entdeckungen liefern weitere Aspekte im Verständnis der funktionellen Bedeutung von miRNAs. Sie geben zudem bei Überlegungen zur Entstehung von Glioblastomen zu bedenken, da das Vorhandensein von miRNAs in amplifizierten „Gen-leeren“ Bereichen erklären kann, warum diese Regionen über lange Zeit in vivo in Glioblastomen amplifiziert bleiben.

Die Expression bzw. Überexpression der neu isolierten miRNAs aus dem amplifizierten BAC 756H6 soll in weiterführenden Northern-Blot Experimenten bestätigt werden und könnte darüber Aufschluss geben, ob diese miRNAs, die in der amplifizierten Chromsomenregion liegen, überexprimiert werden und somit potenziell regulierend auf die Zellen wirken [64]. Da sich die amplifizierten Regionen in verschiedenen Glioblastomzellen unterscheiden, sollten zusätzlich miRNAs aus verschiedenen Glioblastomzellen, u.a. dem Glioblastom H1300, isoliert und untersucht werden.

Neben dem prinzipiellen Array-Design gibt es viele Variablen, die zu unterschiedlichen Resultaten führen könnten, angefangen von der Probenaufarbeitung und Qualität über Amplifizierungsmethoden, die Methode des Markierens, Hybridisierens, Waschens und Scannens bis zur Bildverarbeitung, Datennormalisierung und -analyse und zuletzt der Dateninterpretation.

Des Weiteren konnte unsere Arbeitsgruppe eine durch Hypoxie und Aphidicolin induzierbare *fragile site* FRA12F identifizieren, die unmittelbar in der Nähe des KUB3-Gens lokalisiert ist [25]. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass miRNAs häufig in der Nähe von *fragile sites* lokalisiert sind [11]. Es besteht weiterhin Klärungsbedarf, ob unbekannte miRNAs in der Nähe des KUB3-Gens und der neuen *fragile site* FRA12F lokalisiert sind.

Eine Analyse der gesamten miRNA-Expression im Genom des Glioblastomes mit dem Biochip von der Firma febit holding GmbH (Heidelberg) mittels Geniom Realtime Analyzer und dem Geniom[®] Biochip miRNA homo sapiens, welcher die komplementären Sequenzen zu allen 866 in der Sanger miRBase 12.0 niedergelegten miRNAs und *mature star*-Sequenzen enthält, wird gerade in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die möglichen Angriffspunkte von miRNAs so vielfältig wie ihre Zielgene sind. Durch die Fähigkeiten dieser neuen Molekülklasse, unterschiedlichste Gene vom Transkriptionsfaktor bis hin zum Transmembranrezeptor zu regulieren und dies auch noch in unterschiedlicher Stärke – je nach Bindungsstellen und Komplementarität – potenzieren sich die möglichen Funktionen für miRNAs während der Gliomgenese. Neuere Forschungen zeigen sogar, dass bestimmte miRNAs für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz und der Selbsterneuerung von embryonalen Stammzellen

wichtig sind. Die miRNAs könnten daher in Zukunft nützliche molekularbiologische Werkzeuge für die Manipulation von Stammzellen darstellen [35].

So führt die Identifizierung und Untersuchung von miRNAs vielleicht dazu, dass neue, bislang unbekannte Gene oder Genfunktionen identifiziert werden können. MiRNAs als therapeutisches Mittel besitzen den Vorteil, dass wirklich initial, d.h. schon auf mRNA-Ebene, in maligne wirkende Signalkaskaden eingegriffen werden könnte, anstatt wie sonst üblich die Auswirkungen auf Proteinebene anzugehen. Zusätzlich besitzen miRNAs die interessante Eigenschaft, parallel sehr große Gruppen von Genen zu regulieren. Somit besitzt eine einzige miRNA bzw. ein einziges miRNA-Cluster das Potential, die funktionelle Ausrichtung einer Zelle ganzheitlich umzuprogrammieren. Ihre Beeinflussung könnte in Zukunft somit einen neuartigen, attraktiven gentherapeutischen Ansatz darstellen. Es ist also durchaus vorstellbar, dass Hirntumore, ob primär oder sekundär, unter einem neuen „miRNA-Aspekt“ betrachtet werden. Dies lässt hoffen – auf neue diagnostische oder therapeutische Möglichkeiten, die letztendlich den Patienten zu Gute kommen.

6. Literaturverzeichnis

1. Ambros V (2001) microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* 107(7):823-6. Review.
2. Arteaga-Vazquez M, Caballero-Perez J, Vielle-Calzada JP (2006) A family of microRNAs present in plants and animals. *Plant Cell* 18:3355–69.
3. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2):281-97. Review.
4. Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre JY (2003) Primary brain tumours in adults. *Lancet* 361: 323-31.
5. Bentwich I (2005) Prediction and validation of microRNAs and their targets. *FEBS Lett.* 579(26):5904-10. Review.
6. Bühling KJ, Lepenies J, Witt K (2008) Intensivkurs allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Auflage. Elsevier Urban& Fischer Verlag München Jena
7. Bögler O, Huang HJ, Kleihues P, Cavenee WK (1995) The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia.* 15:308–327.
8. Bredel M, Scholtens DM, Harsh GR, Bredel C, Chandler JP, Renfrow JJ, Yadav AK, Vogel H, Scheck AC, Tibshirani R, Sikic BI (2009) A network model of a cooperative genetic landscape in brain tumors. *JAMA.* 302(3):261-75.
9. Bushati N, Cohen SM (2007) microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 23:175-205. Review.
10. Calin GA, Croce CM (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 6(11):857-66. Review.
11. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2;101(9):2999-3004.
12. Carleton M, Cleary MA, Linsley PS (2007) MicroRNAs and cell cycle regulation. *Cell Cycle* 6(17):2127-32. Review.
13. Castelli EC, Moreau P, Oya e Chiromatzo A, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, Yaghi L, Giuliani S, Carosella ED, Donadi EA (2009) In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Hum Immunol.* 70(12):1020-5.
14. Cavenee WK, Furnari F B, Nagane M, Huang HJS, Newcomb EW, Bigner DD, Weller M, Berens ME, Plate K H, Israel MA, Noble MD, Kleihues P (2000) Tumors of the nervous system. WHO classification of tumors. *International Agency for Research on Cancer Press, Lyon*
15. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS (2005) MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 65(14):6.
16. Cho WC (2007) OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer* 6:60. Review.
17. Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM, Farace MG (2005) Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 334(4):1351-8.

18. Conti A, Aguenouz M, La Torre D, Tomasello C, Cardali S, Angileri FF, Maio F, Cama A, Germanò A, Vita G, Tomasello F (2009) miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II-IV astrocytic tumors. *J Neurooncol.* 93(3):325-32.
19. Coquelle A, Toledo F, Stern S, Bieth A, Debatisse M (1998) A new role for hypoxia in tumor progression: induction of fragile site triggering genomic rearrangements and formation of complex DMs and HSRs. *Mol Cell.* 2(2):259-65.
20. Cowell JK, Matsui S, Wang YD, LaDuca J, Conroy J, McQuaid D, Nowak N (2004) Application of bacterial artificial chromosome array-based comparative genomic hybridization and spectral karyotyping to the analysis of glioblastoma multiforme. *Cancer Genet Cytogenet.* 151(1):36-51.
21. Fischer U, Keller A, Leidinger P, Deutscher S, Heisel S, Urbschat S, Lenhof HP, Meese E (2008) A different view on DNA amplifications indicates frequent, highly complex, and stable amplicons on 12q13-21 in glioma. *Mol Cancer Res.* 6(4):576-84.
22. Fischer U, Leidinger P, Keller A, Folarin A, Ketter R, Graf N, Lenhof HP, Meese E (2009) Amplicons on chromosome 12q13-21 in glioblastoma recurrences. *Int J Cancer.* 2009 Oct 16. [Epub ahead of print]
23. Fischer U, Meese E (2007) Glioblastoma multiforme: the role of DSB repair between genotype and phenotype. *Oncogene* 26(56):7809-15. Review.
24. Fischer U, Meltzer P, Meese E (1996) Twelve amplified and expressed genes localized in a single domain in glioma. *Hum. Genet.* 98:625-628
25. Fischer U, Radermacher J, Mayer J, Mehraein Y, Meese E (2008) Tumor hypoxia: Impact on gene amplification in glioblastoma. *Int J Oncol.* 33(3):509-15.
26. Forsyth PA, Posner JB (1993) Headaches in patients with brain tumors: a study of 111 patients. *Neurology* 43:1678-83.
27. Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2000) Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest.* 80:65-72.
28. Gillies JK, Lorimer IA (2007) Regulation of p27Kip1 by miRNA 221/222 in glioblastoma. *Cell Cycle* 6(16):2005-9.
29. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R (2005) Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123:631-40.
30. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 36:154-8.
31. Huse JT, Brennan C, Hambardzumyan D, Wee B, Pena J, Rouhanifard SH, Sohn-Lee C, le Sage C, Agami R, Tuschl T, Holland EC (2009) The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes Dev.* 23(11):1327-37.
32. Jacobs AH, Kracht LW, Gossmann A, Ruger MA, Thomas AV, Thiel A (2005) Imaging in neurooncology. *NeuroRx.* 2:333-47.
33. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS (2007) Human MicroRNA targets. *PLoS Biol.* 2(11):363.
34. Kefas B, Godlewski J, Comeau L, Li Y, Abounader R, Hawkinson M, Lee J, Fine H, Chiocca EA, Lawler S, Purow B (2008) microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer Res.* 68(10):3566-72.

35. Kim KS, Kim JS, Lee MR, Jeong HS, Kim J (2009) A study of microRNAs in silico and in vivo: emerging regulators of embryonic stem cells. *FEBS J.* 276:2140-9. Review.
36. Kleihues P, Ohgaki H (1999) Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *NeuroOncol.* 1:44-51. Review.
37. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC (2002) The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 61:215-25
38. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foa R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Muller RU, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter HI, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G, Rogler CE, Nagle JW, Ju J, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, Tuschl T (2007) A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129:1401-14
39. Kim H, Huang W, Jiang X, Pennicooke B, Park PJ, Johnson MD (2010) Integrative genome analysis reveals an oncomir/oncogene cluster regulating glioblastoma survivorship. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(5):2183-8.
40. Kuttler F, Mai S (2007) Formation of non-random extrachromosomal elements during development, differentiation and oncogenesis. *Semin Cancer Biol.* 17(1):56-64. Review.
41. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294:853-8
42. Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G (2002) The Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Neuro-Oncology Disease Site Group. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol* 64:259-273
43. Lawler S, Chiocca EA (2009) Emerging functions of microRNAs in glioblastoma. *J Neurooncol.* 92(3):297-306.
44. Lawrie CH (2007) MicroRNAs and haematology: small molecules, big function. *Br J Haematol.* 137(6):503-12. Review.
45. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-54.
46. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115(7):787-98.
47. Li J, Tsai MD, Muscarella P (2004) The nuclear protein p34SEI-1 regulates the kinase activity of cyclin-dependent kinase 4 in a concentration-dependent manner. *Biochemistry* 43 (14):4394-9.
48. Linz U (2010) Commentary on effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-Year analysis of the EORTC-NCIC trial (Lancet Oncol. 2009;10:459-466). *Cancer* [Epub ahead of print]
49. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 114:97-109.
50. Luzi E, Marini F, Sala SC, Tognarini I, Galli G, Brandi ML (2008) Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells is modulated by the miR-26a targeting of the SMAD1 transcription factor. *J Bone Miner Res.* 23:287-95

51. Malzkorn B, Wolter M, Liesenberg F, Grzendowski M, Stühler K, Meyer HE, Reifenberger G (2009) Identification and Functional Characterization of microRNAs Involved in the Malignant Progression of Gliomas. *Brain Pathol.* 2009 Aug 19 [Epub ahead of print]
52. Margraf J (2009) *Bascis Spezielle Pathologie. 1. Auflage. Elsevier Urban & Fischer Verlag München Jena*
53. Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen TW (2006) Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:1102–7.
54. Meister G (2007) miRNAs get an early start on translational silencing. *Cell* 131(1):25-8. Review.
55. Myers MP, Stolarov JP, Eng C, Li J, Wang SI, Wigler MH, Parsons R, Tonks NK (1997) P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:9052–9057.
56. Nelson P, Kiriakidou M, Sharma A, Maniatakis E, Mourelatos Z (2003) The microRNA world: small is mighty. *Trends Biochem Sci.* 28(10):534-40. Review.
57. Nennsteil (2009) *Bascis Allgemeine Pathologie. 1. Auflage. Elsevier Urban & Fischer Verlag München Jena*
58. Nord H, Hartmann C, Andersson R, Menzel U, Pfeifer S, Piotrowski A, Bogdan A, Kloc W, Sandgren J, Olofsson T, Hesselager G, Blomquist E, Komorowski J, von Deimling A, Bruder CE, Dumanski JP, de Ståhl TD (2009) Characterization of novel and complex genomic aberrations in glioblastoma using a 32K BAC array. *Neuro Oncol.* 11(6):803-18. Epub.
59. Novakova J, Slaby O, Vyzula R, Michalek J (2008) MicroRNA involvement in glioblastoma pathogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 386(1):1-5. Review.
60. Olson JJ, Fadul CE, Brat DJ, Mukundan S, Ryken TC (2009) Management of newly diagnosed glioblastoma: guidelines development, value and application. *J Neurooncol.* 93:1-23.
61. Ohgaki H, Kleihues P (2005) Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 64:479-89. Review.
62. Ohgaki H, Kleihues P (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 70:1445-53. Review.
63. Palmieri A, Pezzetti F, Brunelli G, Zollino I, Scapoli L, Martinelli M, Arlotti M, Carinci F (2007) Differences in osteoblast miRNA induced by cell binding domain of collagen and silicate-based synthetic bone. *J Biomed Sci.* 14:777-82
64. Pall GS, Hamilton AJ (2008) Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nat Protoc.* 3(6):1077-84.
65. Pang JC, Kwok WK, Chen Z, Ng HK (2009) Oncogenic role of microRNAs in brain tumors. *Acta Neuropathol.* 117(6):599-611. Review.
66. Papagiannakopoulos T, Shapiro A, Kosik KS (2008) MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res.* 68(19):816.
67. Pasche B, Myers RM (2009) One step forward toward identification of the genetic signature of glioblastomas. *JAMA.* 302(3):325-6.
68. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A (2004) Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 14:1902-10

69. Pipiras E, Coquelle A, Bieth A, Debatisse M (1998) Interstitial deletions and intrachromosomal amplification initiated from a double-strand break targeted to a mammalian chromosome. *EMBO J.* 2;17(1):325-33.
70. Rao SK, Edwards J, Joshi AD, Siu IM, Riggins GJ (2010) A survey of glioblastoma genomic amplifications and deletions. *J Neurooncol.* 96(2):169-79.
71. Reifenberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP (1993) Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res.* 53:2736–2739.
72. Reifenberger G, Reifenberger J, Ichimura K, Meltzer PS, Collins VP (1994) Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2. *Cancer Res.*, 54:4299–4303
73. Reifenberger G, Ichimura K, Reifenberger J, Elkahoun AG, Meltzer PS, Collins VP (1996) Refined mapping of 12q13-15 amplicons in human malignant glioma suggests CDK4/SAS and MDM2 as independent amplification targets. *Cancer Res.*, 56:5141–5145
74. Roush S, Slack FJ (2008) The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol.* 18(10):505-16.
75. Schwab M, Varmus HE, Bishop JM, Grzeschik KH, Naylor SL, Sakaguchi AY, Brodeur G, Trent J (1984) Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to *myc*. *Nature* 308:288–291
76. Silber J, Lim DA, Petritsch C, Persson AI, Maunakea AK, Yu M, Vandenberg SR, Ginzinger DG, James CD, Costello JF, Bergers G, Weiss WA, Alvarez-Buylla A, Hodgson JG (2008) miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med.* 6:14.
77. Sood P, Krek A, Zavolan M, Macino G, Rajewsky N (2006) Cell-type-specific signatures microRNAs on target mRNA expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:2746–51.
78. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ et al (2005) on behalf of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Brain Tumor and Radiotherapy Groups and National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC CTG) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for patients with newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* 352:987–996
79. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T and Takahashi T (2004) Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 64:3753-6
80. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, et al (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:2257–61.
81. Watanabe K, Tachibana O, Sato K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1996) Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol.* 6:217–224.
82. Weinberg R (1996) How cancer arises. *Sci Am.* Vol 275(3), 62-70.
83. Wong CF, Tellam RL (2008) microRNA-26a targets the histone methyltransferase Enhancer of Zeste homolog 2 during myogenesis. *J Biol Chem.* 15:15
84. Zhao Y, Srivastava D (2007) A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci.* 32(4):189-97. Review.

- 85.** Zhou X, Ren Y, Moore L, Mei M, You Y, Xu P, Wang B, Wang G, Jia Z, Pu P, Zhang W, Kang C (2010) Downregulation of miR-21 inhibits EGFR pathway and suppresses the growth of human glioblastoma cells independent of PTEN status. *Lab Invest.* 90(2):144-55.
- 86.** Zhou J, Zhou Y, Yin B, Hao W, Zhao L, Ju W, Bai C (2010) 5-Fluorouracil and oxaliplatin modify the expression profiles of microRNAs in human colon cancer cells in vitro. *Oncol Rep.* 23(1):121-8.

7. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Eckart Meese, Leiter des Instituts für Humangenetik, bedanken, dass er mir die Durchführung meiner Dissertation unter hervorragenden Arbeitsbedingungen ermöglichte und auch bei der Anfertigung dieser Arbeit mit zahlreichen Verbesserungsvorschlägen beratend zur Seite stand.

Meiner Betreuerin Frau Dr. Ulrike Fischer gebührt wohl der größte Dank. Sie hat es mit ihrer nahe zu nie enden wollenden Geduld geschafft, mich in kürzester Zeit in die wichtigsten Methoden und Techniken des wissenschaftlichen Arbeitens einzuführen und mich für diese enorm zu begeistern. Zudem konnte ich mich mit allen Problemen, auch die des Alltags, vertrauensvoll an die sie wenden.

Insgesamt war die Atmosphäre in der Arbeitsgruppe Fischer geprägt von gegenseitiger Kollegialität, Hilfeleistung und guter Kommunikation, dadurch war ein sehr produktives, konzentriertes und kompetentes Arbeiten möglich. Ganz besonders an dieser Stelle erwähnen möchte ich Nunja Habel, die in dieser Zeit und darüber hinaus eine sehr gute Freundin für mich geworden ist.

Nichtsdestotrotz wäre all dies niemals ohne meine Eltern möglich gewesen. Ich danke ihnen, dass sie so viel auf sich genommen haben, um mich in meinem eingeschlagenen Lebensweg zu unterstützen. All meine Kraft für das Studium und diese Dissertation konnte ich nur durch sie schöpfen. Meine „kleinen“ Geschwister Nawid und Alice sind schon immer eine wichtige Stütze in meinem Leben und ich danke ihnen, dass sie nie den gewissen Humor für alle Lebenslagen verloren haben.

Mein wichtigster Dank gilt zur guter Letzt meinem Freund Lorenz Thurner. Ich bin ihm unendlich dankbar, dass ich von seinen Erfahrungen profitieren durfte. Ohne ihn wäre ich meinen Interessen sicherlich nie so zielbewusst und ehrgeizig nachgegangen, weil ich den Mut dazu nicht gehabt hätte. Seiner Unterstützung vor allem bei Rückschlägen, hab ich es verdanken, dass ich diesen Weg trotzdem weitergegangen bin und meine Dissertation in dieser Art fertigstellen konnte.

8. Anhang

A1. Tabellen

Tabelle A.1.1: Reihenfolge der aufgetragenen Spots der Array-miRNA-Hybridisierung des Chromosomenabschnitts 12q13-21

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
PB 1	PB 2	1057 I20	302 B13	133 N21	1136 G11	834 C11	850 F7	616 L12	280 I23	644 F5	603 J24	977 G19	112 B10	74 M13	545 N8	756 H6	G11	571 M6	Cyp	620 J15	58 A17	627 D10	491 C17
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
767 I20	362 K2	176 O5	272 B17	813 P10	777 M1	335 M9	318 e11	424 B7	571 A2	597 C7	267 A1	PB 3	105 F7	410 B16	542 G14	863 H1	704 P17	848 D3	102 B3	742 e7	415 I12	102 9F8	338 e21
49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
629 N8	766 N7	305 O6	221 N13	366 L20	335 I12	754 J4	49 G17	123 O10	473 M14	335 O4	444 B24	PB 4	71 J4	81 H14	450 G15	611 O2	249 J13	324 P9	159 A18	956 e11	588 G21	1082 K22	588 H23
73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
654 D6	934 P3	578 B16	186 F10	578 A9	674 N14	274 M17	404 O18	81 P11	36 P3	530 C5	268 A19	573 G6	380 G5	791 C19	1091 e12	1057 F13	462 L13	235 I1	384 N21			PB 5	PB 6

Tabelle A.1.2: Ergebnisse der quantifizierten Array-miRNA-Hybridisierungen gegen markierte miRN-cDNA der Zellen des TX3868

1.TX3868 nach Standard-Hybridisierungsbedingungen, 2.TX3868 nach veränderten Hybridisierungsbedingungen. Dargestellt sind die gegen den genomischen Spot normalisierten Mittelwerte der Fluoreszenz-Intensitäten ausgewählter BACs und die Standardabweichung s

Spot	BAC-Probe/Name	1.TX3868	2.TX3868
1	PB1	-89	-395
2	PB2	-58	761
3	1057I20	-124	-587
4	302B13	542	3820
5	133N21	612	4577
6	1136G11	749	4492
7	834C11	160	961
8	850F7	-34	1203
9	616L12	-28	77
10	280I23	189	5
11	644F5	247	3549
12	603J24	114	765
13	977G19	284	5292
14	112B10	672	5883
15	74M13	384	2405
16	545N8	366	748
17	756H6	1310	5162
18	Gli	812	-1655
19	571M6	504	-285
20	Cyp	961	1651
21	620J15	282	-309
22	58A17	-74	-2010
23	627D10	-11	-2464
24	491C17	-185	-2370
25	767I20	-244	-1397
26	362K2	-348	-1617
27	176O5	-196	-743
28	272B17	-85	-468
29	813P10	152	1828
30	777M1	2	1629
31	335M9	37	285
32	318 e 11	104	254
33	424B7	-235	-2132
34	571A2	96	1333
35	597C7	-178	-571
36	267A1	-157	-1238
37	PB3	208	2018
38	105F7	46	2369
39	410B16	-7	642
40	542G14	57	-159
41	863H1	-18	-1476
42	704P17	624	1292
43	848D3	-123	-1788
44	1022B3	66	-1445
45	742 e 7	-61	-2490
46	415I12	518	-442

Spot	BAC-Probe/Name	1.TX3868	2.TX3868
47	1029F8	86	-2077
48	338 e 21	503	941
49	629N8	67	-466
50	766N7	-75	3753
51	305O6	-112	-939
52	221N13	15	1290
53	366L20	46	1485
54	335I12	531	7036
55	754J4	290	1850
56	49G17	-195	-974
57	123O10	-168	-49
58	473M14	488	7490
59	335O4	76	2032
60	444B24	283	1389
61	PB4	152	1546
62	71J4	31	1595
63	81H14	664	6178
64	450G15	505	1227
65	611O2	708	3300
66	249J13	655	3150
67	324P9	31	-340
68	159A18	747	4381
69	956 e 11	584	358
70	588G21	254	-841
71	1082K22	77	-1736
72	588H23	-193	-1745
73	654D6	-237	-645
74	934P3	-129	40
75	578B16	-51	-206
76	186F10	-201	4199
77	578A9	-206	-400
78	674N14	162	-594
79	274M17	-159	-1041
80	404O18	-240	-1605
81	81P11	-48	-805
82	36P3	77	-521
83	530C5	658	4502
84	268A19	-197	-830
85	573G6	606	1709
86	380G5	305	328
87	791C19	434	-12
88	1091 e 12	105	-1265
89	1057F13	229	-2171
90	462L13	111	-2132
91	235I1	56	-1686
92	384N21	-112	-1666
93		-613	-3228
94		-548	-3262
95	PB5	-67	-1734
96	PB6	-147	-2195
	s	131	1453

A.2 Material- und Herstellernachweis

A.2.1 Chemikalien, Enzyme, Kits, Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und -platten sind pyrogen- und nukleasefrei.

Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Chloroform	MERCK
Cy3-dCTP	Perkin Elmer/NEN
Cy5-dCTP	Perkin Elmer/NEN
DEPC	SIGMA
EDTA	SIGMA
Essigsäure	MERCK
Ethanol	MERCK
Fixogum	Marabu, Tamm
flashPAGE buffer Kit	Ambion
flashPAGE precast Gels	Ambion
Formaldehyd	MERCK
Gelstar®	Lonzo, Rockland
Global Micro RNA Amplification Kit	System Biosciences
Low Molecular Weight DNA Ladder	New England Biolabs
Isopropanol	MERCK
MOPS	SIGMA
Natriumacetat	MERCK
Omniscript® Reverse Transcriptase Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Mini Kit	Qiagen; Hilden
RNaseA	SIGMA
RNA Ladder	New England Biolabs
SDS	MERCK
Tris	MERCK
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Alle weiteren, hier nicht genannten Puffersalze und Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen) oder Serva (Heidelberg) bezogen.

A.2.2 Lösungen

Alle Lösungen wurden mit Aqua dest. unter möglichst reinen Bedingungen angesetzt. Im Folgenden sind die häufig benutzten Lösungen angegeben, die speziellen finden sich bei der jeweiligen Technik im Methodenteil.

DEPC-H ₂ O	100 ml H ₂ O 100 µl DEPC 2 h bei 37°C inkubieren, anschließend Autoklavieren
3 M Natriumacetat	1 M Natriumacetat Mit Essigsäure auf pH 7,0 einstellen + 100 µl DEPC ü.N. bei 37°C, anschließend Autoklavieren
10 x MOPS Puffer	0,2 M Mops 0,05 M Natriumacetat 0,01 M EDTA mit NaOH auf pH 5.5-7 einstellen + 100 µl DEPC ü.N. bei 37°C, nach Autoklavieren dunkel lagern
10 % SDS	20 g SDS 200 ml H ₂ O
50 x TAE-Puffer	2 M Tris 1 M Essigsäure 50 mM EDTA mit HCl auf pH 8 einstellen, Ansatz 1l
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,6) 1 mM Na ₂ EDTA

A.2.3 Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Brutschrank	begast	Memmert
Elektrophorese	flashPage Fractionator	Ambion
Elektrophoresekammer	Easy Cast Elektrophoresis System	Owl Scientific
Heizblock	TCR 100	Roth
Kühlschrank	Superöko	Privileg
Photometer	Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Power Supply	E 863	Consort
Rotamix	Unimax 1010	Heidolph
Thermocycler	PTC 200	MJ Research
Tiefkühlschrank	Ultra Low	Sango
Vortex-Gerät	VF2	IKA
Waage	1574	Sartorius
Wasserbad	Thermomix	Braun
UV-Bestrahler	UV Transilluminator	Wealtec
Zentrifuge	5417 R	Eppendorf

A.3 Sequenzen

Die folgenden Sequenzen wurden bei der Ansequenzierung der BAC-Klone 159A18 und 956e11 erstellt:

A.3.1 hsa-miR-1826

BAC Klon	Abschnitt	Sequenz
159A18_8	49-73 bp	5' AGCGACGCTCAGACAGGCGTAGCCCCGGGAGGAACCCGGGGCCGCAAGT GCGTTCGAAGTGTCGATGATCAATGTGTCCTGCAATTCACATTAATTCTCG CAGCTAGCTGCGTTCTTCATCGACGCACGAGCCGAGTGATCCACCGCTAAG AGTCGTACCCC-3'
159A18_11	50-73 bp	5' AGCGACGCTCGGACAGGCGTAGCCCCGGGAGGAACCCGGGGCCGCAAGC GCGTTCGAAGTGTCGATGATCAATGTGTCCTGCAATTCACATGAATTCTCG CAGCTAGCTGCGTTCTTCATCGACGCATGAGCCGAGTGATCCACCGCTAAG AGTCGTACCCC-3'
159A18_12	55-79 bp	5' TCGGCAAGCGGCGCTCAGACAGGCGTAGCCCCGGGAGGAACCCGGGGCC GCAAGTGCCTTCGAAGTGTCGATGATCAATGTGTCCTGCAATTCACATTAA TTCTCGCAGCTAGCTGCGTTCTTCATCGACGCACGAGCCGAGTGATCCACC GCTAAGAGTCCCC-3'
159A18_15	49-73 bp	5' AGCGACGCTCAGACAGGCGTAGCCCCGGGAGGAACCCGGGGCCGCAAGT GCGTTCGAAGTGTCGATGATCAATGTGTCCTGCAATTCACATTAATTCTCG CAGCTAGCTGCGTTCTTCATCGACGCACGAGCCGAGTGATCCACCGCTAAG AGTCGTACCCC-3'

A.3.2 Homo sapiens 28S ribosomal RNA

BAC Klon	Sequenz
956E11_6	5' CTTAAAACCCAAAAGGTCAGAAGGATCGTGAGGCCCGCTTTCACGGTCTGTATTCTG TACTGAAAATCAAGATCAAGCGAGCTTTTGCCTTCTGCTCCCC-3'
956E11_7	5' ACAAACCCCTTGTGTGCGAGGGCTGACTTTCAATAGATCGCAGCGAGGGAGCTGCTCTG CTACGTACGAAACCCCGACCCAGAAGCAGGTCGTCTTCCC-3'
956E11_13	5' ACAAACCCCTTGTGTGCGAGGGCTGACTTTCAATAGATCGCAGCGAGGGAGCTGCTCTG CTACGTACGAAACCCCGACCCAGAAGCAGGTCGTCTACGAATGGTTTAGCGCCAGGTTT CCCACGAACGTGCTGTGCGTGCCC-3'
956E11_15	5' CCCTGTGGTAACTTTTCTGACACCTCCTGCTTAAAACCCAAAAGGTCAGAAGGATCG TGAGGCCCGCTTTCACGGTCTGTATTCTGACTGAAAATCAAGATCAAGCGAGCTTTTG CCCTTCTGCTCCCC-3'

A.3.3 miRNA-Sequenzen

miRNA	Sequenz
hsa-miR-16-1	5'-UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG-3'
hsa-miR-21	5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3'
hsa-miR-26a-2	5'-UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU-3'
hsa-miR-616	5'-AGUCAUUGGAGGGUUUGAGCAG-3'

A.4 Primersequenzen

A.4.1 RT-Primer

Primer	Sequenz
rt6-hsa-miR16-1	5'-tgt cag gca acc gta ttc acc gtg agt ggt cgc caa-3'
rt6-hsa-miR-21	5'-tgt cag gca acc gta ttc acc gtg agt ggt tca aca-3'
rt6-hsa-miR-26a-2	5'-tgt cag gca acc gta ttc acc gtg agt ggt agc cta-3'
rt6-hsa-miR-616	5'-tgt cag gca acc gta ttc acc gtg agt ggt ctg ctc-3'

A.4.2 miRNA spezifische Umschreibe-Primer

Primer	Sequenz
mp forward	5'-tgt cag gca acc gta ttc acc-3'
mp reverse	5'-cgt cag agt tcc gag tag agg-3'
mp forward (neu)	5'-gtc agg caa ccg tat tca ccg-3'
mp reverse (neu)	5'-gcg tca gat gtc cga gta gag-3'
short-miR-16-reverse	5'-cgt cag atg tcc gag tag agg ggg aac ggc gta gca gca cgt aaa ta-3'
short-miR-21-reverse	5'-cgt cag atg tcc gag tag agg ggg aac ggc gta gct tat cag act ga-3'
short-miR-26a-reverse	5'-cgt cag atg tcc gag tag agg ggg aac ggc gtt caa gta atc cag gt-3'
short-miR-616-reverse	5'-cgt cag atg tcc gag tag agg ggg aac ggc gag tca ttg gag ggt tt-3'

A.4.3 miRNA spezifische Forward- /Reverse-Primer

Primer	Sequenz
hsa-miR-16-1 forward	5'-cag gaa aca gct atg acc atg cat agc agc acg -3'
hsa-miR-16-1 reverse	5'-gga aca ggc tat gac cat gca cgc caa tat tta c-3'
hsa-miR-26a-2 forward	5'-cag gaa aca gct atg acc atg cat tca agt aat c-3'
hsa-miR-26a-2 reverse	5'-gga aca ggc tat gac cat gca agc cta tcc tg-3'
hsa-miR-616 forward	5'-cag gaa aca gct atg acc atg caa gtc att gga g-3'
hsa-miR-616 reverse	5'-gga aca ggc tat gac cat gca ctg ctc aaa gg-3'

A. 4.4 miRNA-Adaptorprimer

Primer	Sequenz
miRNA forward	5'-cta ata cga ctc act ata ggg a-3'
miRNA reverse	5'-taa tac gac tca cta tag gcc a-3'

A. 5 Längenstandards

A. 5.1 RNA Ladder (New England Biolabs)

Das Gemisch enthält Fragment folgender Länge (in bp):

200 – 300 – 400 – 600 – 800 – 1000

A. 5.2 Low Molecular Weight DNA Ladder (New England Biolabs)

Das Gemisch enthält Fragment folgender Länge (in bp):

25 – 50 – 75 – 100 – 150 – 200 – 250 – 300 – 350 – 500 – 766