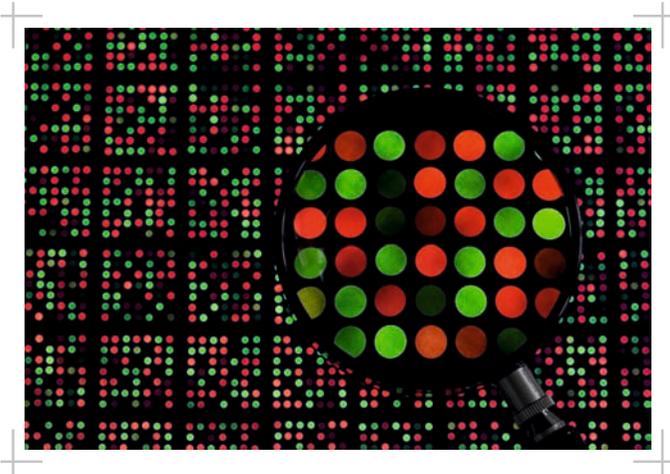


Etablierung von micro-RNA Microarrays und deren
Verwendung zur Analyse hypoxieinduzierter Regulation in
humanen Fibroblasten der pulmonalvaskulären Adventitia

Tobias Dombrowski



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Etablierung von micro-RNA Microarrays und deren
Verwendung zur Analyse hypoxieinduzierter Regulation in
humanen Fibroblasten der pulmonalvaskulären Adventitia**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Tobias Dombrowski
aus Hagen in Westfalen

Gießen 2014

Aus dem Institut für Pathologie
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Direktor: Prof. Dr. S. Gattenlöhner

Gutachter: Prof. Dr. L. Fink

Gutachter: Prof. Dr. Dr. T. Braun

Tag der Disputation: 20.10.2015

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Tobias Dombrowski

I. Inhaltsverzeichnis

I.	INHALTSVERZEICHNIS	I
II.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
III.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
IV.	TABELLENVERZEICHNIS	VIII
V.	VERZEICHNIS NICHT GEKENNZEICHNETER ENGLISCHER BEGRIFFE	IX
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	X
VII.	SUMMARY	XII
1	EINLEITUNG	- 1 -
1.1	PULMONALE HYPERTONIE	- 2 -
1.2	HYPOXIE UND PULMONALE HYPERTONIE	- 3 -
1.3	REGULATION DES ZELLSTOFFWECHSELS UND DER ZELLDIFFERENZIERUNG	- 5 -
1.4	MICRO-RNAs	- 5 -
1.4.1	<i>Synthese, Wirkmechanismen und Funktion</i>	- 6 -
1.4.2	<i>Nomenklatur</i>	- 9 -
1.4.3	<i>Identifikation von miRNA-Zielgenen</i>	- 9 -
1.4.4	<i>Hypoxie, pulmonale Hypertonie und klinische Anwendungen</i>	- 10 -
1.5	MICROARRAYS	- 11 -
1.5.1	<i>Aufbau</i>	- 12 -
1.5.2	<i>Ablauf eines Microarray-Experiments zur Untersuchung von RNA-Proben</i>	- 12 -
1.6	ZIELE DIESER ARBEIT	- 14 -
2	MATERIALIEN UND METHODEN	- 15 -
2.1	ZELLEN	- 15 -
2.1.1	<i>Humane Lungenfibroblasten</i>	- 15 -
2.1.1.1	Allgemeines / Ethik	- 15 -
2.1.1.2	Isolation adventitieller Fibroblasten aus der pulmonalarteriellen Strombahn	- 15 -
2.1.1.3	Isolation interstitieller Fibroblasten aus Lungengewebe	- 16 -
2.1.2	<i>Maus-Kardiomyozyten</i>	- 16 -
2.1.3	<i>NIH / 3T3-Zellen</i>	- 16 -
2.1.4	<i>Kultur</i>	- 17 -
2.1.4.1	Allgemeines	- 17 -
2.1.4.2	Normoxie	- 17 -
2.1.4.3	Hypoxie	- 17 -
2.1.5	<i>Verwendete Materialien</i>	- 18 -
2.2	RNA-EXTRAKTION	- 18 -

Inhaltsverzeichnis

2.2.1	<i>Phenol-Guanidin-Extraktion mit Säulenaufreinigung</i>	- 18 -
2.2.2	<i>Phenol-Guanidin-Extraktion mit Fällung</i>	- 19 -
2.2.3	<i>Kapillarelektrophorese</i>	- 19 -
2.2.4	<i>Spektrophotometrie</i>	- 20 -
2.2.5	<i>Verwendete Materialien</i>	- 20 -
2.3	REAL-TIME-PCR	- 21 -
2.3.1	<i>cDNA Synthese</i>	- 22 -
2.3.1.1	Denaturierung.....	- 22 -
2.3.1.2	Protokoll cDNA Synthese	- 22 -
2.3.2	<i>Durchführung</i>	- 23 -
2.3.3	<i>Verwendete Materialien</i>	- 24 -
2.4	REAL-TIME PCR MIT MICRORNAS	- 25 -
2.4.1	<i>Verwendete Materialien</i>	- 26 -
2.5	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	- 26 -
2.5.1	<i>Durchführung</i>	- 27 -
2.5.2	<i>Verwendete Materialien</i>	- 28 -
2.6	FLUORESZENZ-MARKIERUNG (LABELLING).....	- 28 -
2.6.1	<i>Allgemeines</i>	- 28 -
2.6.2	<i>Exiqon miRCURY LNA™ microRNA Array Power Labelling Kit</i>	- 28 -
2.6.3	<i>T4-Ligase vermitteltes Labelling</i>	- 29 -
2.6.4	<i>Verwendete Materialien</i>	- 31 -
2.7	MICROARRAYS.....	- 32 -
2.7.1	<i>Micro-RNA Microarrays</i>	- 32 -
2.7.1.1	Allgemeines	- 32 -
2.7.1.2	Locked Nucleic Acids (LNA™)	- 32 -
2.7.1.3	MiChip Microarray Plattform	- 33 -
2.7.1.4	miRCURY LNA™ microRNA Array Kit.....	- 34 -
2.7.1.5	miRXplore™ Microarray Kit:	- 34 -
2.7.2	<i>mRNA Microarrays</i>	- 34 -
2.7.3	<i>Verwendete Materialien</i>	- 35 -
2.8	DATENVERARBEITUNG UND –AUSWERTUNG	- 37 -
2.8.1	<i>MiRNA- und mRNA-Array Auswertung im Speziellen</i>	- 37 -
2.8.2	<i>Online Ressourcen</i>	- 41 -
2.9	GERÄTE	- 42 -
2.9.1	<i>Software</i>	- 42 -
3	ERGEBNISSE	- 43 -
3.1	TECHNISCHE ETABLIERUNG DER METHODE.....	- 43 -
3.1.1	<i>Probenaufreinigung / RNA-Extraktion</i>	- 43 -
3.1.2	<i>Markierung der micro-RNA / Labelling</i>	- 45 -
3.1.3	<i>Vergleich verschiedener Microarray-Hersteller</i>	- 50 -

Inhaltsverzeichnis

3.2	ETABLIERUNG EINER AUSWERTUNG	- 52 -
3.2.1	<i>Hintergrundkorrektur</i>	- 52 -
3.2.2	<i>Normalisierung und Teststatistik</i>	- 53 -
3.3	VERSUCHSREIHE PULMONALARTERIEFIBROBLASTEN	- 58 -
3.3.1	<i>Biologische Ergebnisse der Versuchsreihe</i>	- 60 -
3.4	VERSUCHSREIHE MAUS-MYOKARD	- 65 -
3.4.1	<i>Einleitung</i>	- 65 -
3.4.2	<i>Versuchsaufbau</i>	- 65 -
3.4.3	<i>Microarrays</i>	- 66 -
3.5	MIRNA-ZIELGEN-ANALYSE / SIGNALWEG-ANALYSE	- 69 -
3.5.1	<i>Integration von mRNA-Microarrays</i>	- 72 -
4	DISKUSSION	- 76 -
4.1	ETABLIERUNG DER METHODE	- 76 -
4.1.1	<i>Probenaufreinigung und Labelling</i>	- 76 -
4.1.2	<i>Microarrays</i>	- 79 -
4.1.3	<i>Hintergrundkorrektur, Normalisierung und Teststatistik</i>	- 80 -
4.2	VERSUCHSREIHE PULMONALARTERIEFIBROBLASTEN	- 82 -
4.3	VERSUCHSREIHE MAUS-MYOKARD	- 90 -
4.4	BIOINFORMATIK	- 94 -
4.4.1	<i>Datenverarbeitung und -analyse mit R</i>	- 94 -
4.4.2	<i>Zielgen- und Signalweganalyse anhand von miRNA-Microarrays</i>	- 94 -
4.4.3	<i>Zusammenfassung Bioinformatik</i>	- 96 -
5	LITERATURVERZEICHNIS	- 97 -
6	VERÖFFENTLICHUNGEN	- 106 -

II. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
A	Adenosi
bp	Basenpaare
C	Cytosin
chr	Chromosom
c _t	<i>Cycle of threshold</i> / Schwellenzyklus
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Cyanin 5
d	desoxy-
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
dUTP	Desoxy-Uridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	European Molecular Biology Lab
et al.	<i>et alii</i>
Fa	Firma
Fdr	<i>false discovery rate</i>
F _i O ₂	Inspiratorische Sauerstoff-Fraktion / -Partialdruck
FP	<i>forward primer</i> / Vorwärts-Primer
FPAH	Familiäre pulmonalerterielle Hypertonie
G	Guanin
h	Stunden
HInf	<i>Haemophilus influenzae</i>
hsa	<i>Homo sapiens</i>
ID	Identifikator
IPAH	Idiopathische pulmonalerterielle Hypertonie
KEGG	<i>Kyoto encyclopedia of genes and genomes</i>
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
logFC	Logarithmus zur Basis 10 des <i>fold change</i> (Änderungsfaktor)
M	Molar
min	Minuten

Abkürzungsverzeichnis

miRNA	miRNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmu	<i>Mus musculus</i>
mol	Mol
mPAP	<i>Mean pulmonary artery pressure</i> / mittlerer pulmonalerterieller Druck
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MuLV	Moloney murines Leukämievirus
n	Anzahl
ng	Nanogramm
NIH	Embryonale Zelllinie Mausfibroblasten
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
nt	Nukleotide
O ₂	Sauerstoff
p	<i>probability</i> / Wahrscheinlichkeit
P	<i>pressure</i> / Druck
P _A	Alveolardruck
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pg	Pikogramm
PGK1	Phosphoglyceratkinase 1
pre-miRNA	<i>precursor micro-RNA</i> / Vorläufer micro-RNA
pri-miRNA	<i>primary micro-RNA</i> / primäre micro-RNA
\dot{Q}	Perfusion
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
r	Korrelationskoeffizient
RIN	<i>RNA integrity number</i> / RNA-Integritätswert
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>reverse primer</i> / Rückwärts-Primer
rRNA	Ribosomale RNA
s	Sekunde
s.u.	siehe unten
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SNR	<i>signal-to-noise-ratio</i> (Signal-Rausch-Verhältnis)

Abkürzungsverzeichnis

sog.	sogenannte/r
T	Temperatur
Taq	Thermus aquaticus
T _m	Schmelztemperatur
U	Enzymeinheit
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
UDG	Uracil-DNA-Glykosilase
UTR	<i>untranslated region</i>
V	Version
v/v	<i>volume / volume</i> , Volumen / Volumen
\dot{V}_A	Ventilation
VSN	varianzstabilisierende Normalisierung
w/v	<i>weight / volume</i> , Gewicht / Volumen
z.T.	zum Teil

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	miRNA Synthese und Zusammenbau in mikro-Ribonukleoproteine	8 -
Abbildung 1.2	Arbeitsdiagramm Microarray	13 -
Abbildung 1.3	Zweifarbiges (oben) und Einfarbiges (unten) Microarray	14 -
Abbildung 2.1	Beispiel für einen Boxplot	38 -
Abbildung 2.2	Schema der Bildanalyse eines Microarrays	39 -
Abbildung 3.1	Probencharakteristika abhängig vom Waschprotokoll	43 -
Abbildung 3.2	Korrelation vor und nach Säulenaufreinigung	44 -
Abbildung 3.3	Perzentilen vor und nach Säulenaufreinigung	45 -
Abbildung 3.4	\log_2 der Vordergrundintensitäten	46 -
Abbildung 3.5	Intensitätsverteilungen abhängig von erneutem Waschen	48 -
Abbildung 3.6	Analyse des Farbeffektes bei zweifarbiger Hybridisierung	49 -
Abbildung 3.7	Intensitätsverteilung <i>self-self</i> Hybridisierung Exiqon/ Miltenyi	50 -
Abbildung 3.8	<i>self-self</i> Hybridisierung auf dem miChip	51 -
Abbildung 3.9	Zusammengefasste Standardfehler	52 -
Abbildung 3.10	Anzahl signifikant regulierter miRNAs an angegebenen Zeitpunkten	54 -
Abbildung 3.11	Volcano-Plots der verschiedenen Normalisierungsmethoden	55 -
Abbildung 3.12	Korrelationsbild vor (links) und nach (rechts) Aussortierung	56 -
Abbildung 3.13	Fortsetzung der Abbildung 3.12	57 -
Abbildung 3.14	Δc_t -Werte (dCt)	59 -
Abbildung 3.15	Summierte und korrigierte Vordergrundintensitäten	59 -
Abbildung 3.17	Volcano Plot Normoxie / Hypoxie	61 -
Abbildung 3.18	Korrelationsbild Versuch Pulmonalarterienfibroblasten	61 -
Abbildung 3.19	Signifikant regulierte miRNAs im Microarray	62 -
Abbildung 3.20	Real-Time-PCR-Validierung	62 -
Abbildung 3.21	Übersicht Modell Maus-Myokard	65 -
Abbildung 3.22	Volcano-Plots Infarkt und Reflow gegen Kontrolle	67 -
Abbildung 3.23	Volcano-Plots Infarkt gegen Reflow	67 -
Abbildung 3.24	Heatmap Infarkt / Reflow gegen Kontrolle	68 -
Abbildung 3.25	Schnittmengen regulierter Zielgene mit 20% fdr	75 -
Abbildung 3.26	Schnittmengen der Zielgene gesamt	75 -
Abbildung 4.1	Regulationsmodell	89 -

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1	Zweiseitige Anova Normalisierung / Hintergrundkorrektur.....	- 53 -
Tabelle 3.2	ΔC_t / RIN	- 58 -
Tabelle 3.3	Top 10 miRNAs nach Regulation (logFC).....	- 63 -
Tabelle 3.4	Top 10 miRNAs nach Abundanz	- 63 -
Tabelle 3.5	Top 10 miRNAs, sortiert nach korrigiertem p-Wert	- 64 -
Tabelle 3.6	p-Wert Signalwege berechnet nach t-Wert ($p_{t(fdr)} < 0.05$).....	- 70 -
Tabelle 3.7	p-Wert Signalwege berechnet nach Koeffizient ($p_{koef(fdr)} < 0,05$).....	- 71 -
Tabelle 3.8	Schnittmenge Signalwege nach Koeffizient	- 73 -
Tabelle 3.9	Schnittmenge Signalwege nach t.....	- 73 -
Tabelle 3.10	Im mRNA-Array signifikant-regulierte Zielgene nach fdr.....	- 74 -
Tabelle 3.11	Im mRNA-Array signifikant-regulierte Zielgene nach Koeffizient	- 74 -
Tabelle 4.1	Regulierte miRNAs in verschiedenen PAH-Modellen	- 88 -
Tabelle 4.2	Chromosomenloci der signifikant regulierten miRNAs mit LFC > 1	- 93 -

V. Verzeichnis nicht gekennzeichnete englischer Begriffe

Folgende schwierig zu übersetzende Begriffe werden aufgrund der häufigen Verwendung zur Vereinfachung und Verbesserung des Textflusses nicht kursiv gedruckt, sondern bezüglich Schriftbild und Grammatik wie deutsche Begriffe verwendet:

Labelling

Microarray

Primer

Real-Time-PCR

Remodelling

Slide

VI. Zusammenfassung

Die pulmonalarterielle Hypertonie ist durch eine chronische Druckerhöhung des pulmonal-arteriellen Mitteldruckes gekennzeichnet. Pathogenetisch bedeutsam ist die Trias von Vasokonstriktion, Thrombose und Gefäßumbauprozessen (Remodelling) in den Pulmonalgefäßen. Die Erkrankung führt zu Belastungsdyspnoe, Cor pulmonale und Rechtsherzdekompensation. In der Frühphase der Erkrankung spielen pathogenetische Prozesse in pulmonalvaskulären Fibroblasten der Adventitia vermutlich eine wichtige Rolle. Die Beteiligung von microRNAs (miRNAs) hierbei ist kaum untersucht.

Die Ziele dieser Arbeit gliedern sich in mehrere Schritte. Zunächst soll eine möglichst robuste Plattform für das Labelling, die Hybridisierung und die Auswertung von miRNA-Microarrays etabliert werden. Im Anschluss sollen humane pulmonalarterielle Fibroblasten auf die Regulation von miRNAs unter 24h Hypoxie untersucht werden. Die zelluläre Antwort auf miRNA-Ebene soll schließlich mit bekannten Faktoren des adventitiellen Remodellings von Pulmonalarterien bei pulmonalarterieller Hypertonie verknüpft werden.

Fibroblasten humaner Pulmonalarterien wurden kultiviert und für 24h unter Normoxie oder Hypoxie ($F_{iO_2}=1\%$) inkubiert. Mit einer Phenol-Guanidin-basierenden Methode erfolgte die Extraktion der gesamten RNA. Der Erfolg der Hypoxie-Stimulation wurde durch die Messung des Gens PGK1 mittels Real-Time-PCR bestätigt. Die miRNA wurde mit Hilfe einer T4-Ligase an einen Cy-Farbstoff-konjugiertes Oligoribonukleotid gebunden. Die farbstoffmarkierten miRNAs wurden nach Vergleich verschiedener Microarray-Hersteller auf miChip-Microarrays hybridisiert. Die Validierung der miRNA-Expression erfolgte mittels qRT-PCR. Zur Datenverarbeitung wurde die Software R verwendet. Die miRNA-Zielgenvorhersage und Verknüpfung mit KEGG-Signalwegen erfolgte gestützt auf einen selbst entwickelten Algorithmus. Dessen Ergebnisse wurden mit der KEGG-Signalweg-Analyse basierend auf Agilent Whole Genome Microarrays verglichen.

In der Etablierungsphase ergab die vergleichende Durchführung verschiedener Methoden Vorteile für T4-Ligase-vermitteltes Labelling auf miChip Microarrays. Die Microarray-Analyse ergab dass Hypoxie in den untersuchten Fibroblasten miR-210, -744 und -296 induzierte, und miR-183 supprimierte. Die qRT-PCR validierte mit Ausnahme von miR-296 die Regulation der identifizierten miRNAs signifikant. Die komparative Signalweg Analyse ermittelte etwa 60% der durch den entwickelten Algorithmus vorhergesagten Signalwege auch über mRNA-Microarrays.

Insbesondere miR-210, eine wichtige HIF-1 α -/2 α -induzierte und bekannt hypoxie-regulierte miRNA, jedoch auch miR-183 und -744 können über ihre Zielgene mit pa-

Zusammenfassung

thogenetischen Mechanismen der PAH wie Angiogenese, Remodelling, Zelldifferenzierung und Zellzyklusarrest verknüpft werden. Ihre Bedeutung im Zusammenhang mit pulmonalarterieller Hypertonie war bisher unbekannt und führt gleich zu mehreren potentiellen Ansätzen weiterführender Forschung. Der entwickelte Algorithmus zur Signalweganalyse basierend auf miRNA-Microarrays zeigt vergleichbare Ergebnisse zur Signalweganalyse über mRNA-Microarrays und ist damit eine interessante Möglichkeit zur weiterführenden Betrachtung des biologischen Kontexts von miRNA-Microarray-Ergebnissen.

VII. Summary

Pulmonary arterial hypertension is a disease characterized by chronic elevation of pulmonary arterial mean pressure. Driven by the triad of vasoconstriction, thrombosis and vascular remodeling of the pulmonary artery, the disease leads to incipient dyspnea and finally to right heart failure. At the early pathogenesis, the vascular adventitial fibroblasts seem to play a crucial role. Here, the participation of microRNAs (miRNAs) is yet poorly understood.

Aims of this work are at first the establishment of a robust miRNA-Microarray platform including labelling, hybridization and data analysis. Afterwards miRNA-profiles of human pulmonary arterial fibroblasts were measured to link them to known mechanisms of pulmonary arterial vascular remodeling.

Fibroblasts from pulmonary arteries of a healthy human lung were cultured and kept under normoxic and hypoxic ($FiO_2=0.01$) conditions for 24h. Total RNA was isolated using a phenol-/guanidine-based method. Success of the hypoxic treatment was confirmed by measuring the expression of the PGK1 gene by quantitative real-time PCR. The miRNA was labelled by T4-Ligase-mediated linking of Cy-Dye-conjugated oligoribonucleotides. Labelled miRNAs were hybridized to miChip after comparison of different microarray suppliers. Validation of miRNA expression levels was done with qRT-PCR. R software for statistical computing was used for data analysis. miRNA target prediction and KEGG pathway analysis were performed with in-house target-weighting-algorithms. Results were compared with KEGG pathway analysis based on Agilent Whole Genome microarrays.

The comparison of different workflows reveals advantages for T4-ligase-mediated labelling and miChip microarrays. MiR-210, -744 and -296-5p were found to be upregulated whilst miR-183 was downregulated in response to hypoxia in microarrays. qRT-PCR validated each significantly, whereas miR-296-5p was only significant at 10% level. Comparative pathway analysis revealed more than 60% of pathways predicted by our scoring algorithm enriched in mRNA-microarray's pathways.

Since the HIF-1 α - and -2 α -induced miR-210 is a major hypoxia-regulated miRNA, its regulation confirms the validity of our results. However, none of the regulated miRNAs has yet been linked to hypoxia in PAH but can be connected to pathogenetic mechanisms as angiogenesis, remodelling, cellular differentiation and cell cycle arrest by miRNA target analysis. This leads to several possible anchors for future research. The pathway prediction based on weighting algorithms seems to be a viable approach as its results are comparable to results based on real mRNA expression data.

1 Einleitung

Die Lunge (Pulmo) des Menschen ist ein paarig angelegtes Organ, welches den größten Teil des menschlichen Thorax ausfüllt. Die Hauptaufgabe innerhalb des Organsystems ist die äußere Atmung (Ventilation), also die Aufnahme von Sauerstoff (O_2) und die Abgabe von Kohlendioxid (CO_2). Außerdem ist die Lunge an der Regulierung des Wasser- und Wärmehaushaltes beteiligt und nimmt metabolische Aufgaben wahr.^{1,2}

Das Organ wird anatomisch zunächst in die linke und rechte Lunge aufgeteilt. Die rechte Lunge gliedert sich weiter in einen Ober- Unter- und Mittellappen (Lobus superior, -inferior und -medius), die linke Lunge besitzt aufgrund der linksbetonten Herzlage im Thorax lediglich einen Ober- und Unterlappen. Die Lungenlappen sind in Segmente aufgeteilt, rechts gibt es drei Ober-, zwei Mittel- und fünf Unterlappensegmente, links fünf Ober- und vier Unterlappensegmente. Durch das Bronchialsystem ist die Lunge als Bestandteil der unteren Atemwege an die Luftröhre (Trachea) angebunden, welche über den Kehlkopf (Larynx) an die oberen Atemwege Anschluss findet. Durch Konvektion gelangt Luft über die oberen Atemwege, Larynx und Trachea zunächst in den linken und rechten Hauptbronchus, dann analog zur Lungengliederung in Lappen- und Segmentbronchien und nach weiterer Aufzweigung in Läppchenbronchien und Bronchioli in die Bronchioli terminales. In den folgenden Bronchioli respiratorii und Alveolen findet der Gasaustausch zwischen Luft und Blut durch Diffusion über die Alveolarwand statt, wiederum durch Konvektion wird dann der Sauerstoff mit dem Blutstrom weitertransportiert, um im Bereich der Kapillaren in das Interstitium und die jeweilige Körperzelle zu diffundieren.

Das sauerstoffarme Blut kommt aus dem venösen System von der rechten Herzkammer durch den Truncus pulmonalis und den daraus entspringenden Pulmonalarterien (Arteriae pulmonales), der Abtransport erfolgt durch die Pulmonalvenen (Venae pulmonales) in den linken Vorhof (sog. Vasa publica). Über direkte, dem Verlauf der Bronchien und Bronchiolen folgende Äste aus der Aorta (Rami bronchiales) wird das Lungengewebe selbst mit Blut versorgt (sog. Vasa privata).

Die Funktion der Lunge ist in erster Linie von zwei Faktoren abhängig: Der Durchblutung der Vasa publica (Perfusion, \dot{Q}) und der Belüftung des Alveolarraumes (Ventilation, \dot{V}_A). Diese werden durch das Ventilations-Perfusions-Verhältnis (\dot{V}_A / \dot{Q}) in Beziehung zueinander gesetzt, da ein effektiver Gasaustausch nur bei Homogenität von Ventilation und Perfusion gewährleistet ist ($\dot{V}_A / \dot{Q} \approx 1$). Da sowohl die Perfusion (Addi-

tion des hydrostatischen Drucks der Blutsäule in basalen Lungenabschnitten und Komprimierung der Kapillaren durch den Alveolardruck (P_A) in apikalen Lungenabschnitten bei aufrechter Thoraxstellung) als auch die Alveolarventilation (schwerkraftbedingte höhere Belüftung der Lungenbasis) prinzipiell inhomogen sind, existiert ein Mechanismus zur Regulation der lokalen Alveolarperfusion, die sog. hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV, auch Euler-Liljestrand-Mechanismus).³ Dadurch wird bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck durch lokale Mediatoren die Perfusion des betroffenen Lungenabschnitts reduziert.¹ Neben dieser innerhalb von Sekunden auftretenden physiologischen Antwort unterscheidet man weiterhin die prolongierte alveolare Hypoxie innerhalb von Minuten und Stunden und die chronische Hypoxie, welche zu dauerhaften vaskulären Umbauvorgängen und letztendlich zur pulmonalen Hypertonie und zum Cor pulmonale führen kann.⁴ Die prolongierte alveoläre Hypoxie kann dabei ebenfalls physiologisch sein, oder aber die Übergangsphase zur chronischen Hypoxie darstellen.

1.1 Pulmonale Hypertonie

Die pulmonale Hypertonie ist definiert als eine chronische Erhöhung des pulmonal-arteriellen Mitteldruckes über 20mmHg in Ruhe und über 30mmHg unter Belastung. Nach der Venedig-Klassifikation von 2003 wird die pulmonale Hypertonie entsprechend ihrer Ursache in fünf Kategorien mit Unterkategorien eingeteilt. In der ersten Kategorie ist dabei die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) klassifiziert, die anderen Kategorien enthalten die pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen, Lungenerkrankungen, Thrombosen/ Embolien und verschiedenen anderen Ursachen.

Demnach wird die PAH weiter aufgeteilt in die idiopatische PAH (IPAH), die familiäre PAH (FPAH, vorwiegend mit nachgewiesener Mutation der Proteinkinase *Bone morphogenetic protein receptor type II* bzw. BMPR2), die mit Erkrankungen und Medikamenten assoziierte PAH (APAH) sowie die PAH bei venösen oder kapillären Lungenerkrankungen und die PAH bei Neugeborenen.

Die IPAH tritt mit einer Inzidenz von 1/100 000/ Jahr auf und betrifft gehäuft jüngere Frauen. Das Krankheitsbild wird verursacht von einer pathogenetischen Trias von Vasokonstriktion, Thrombosen und Gefäßumbauprozessen (Remodelling) in den Pulmonalgefäßen. Die Klinik ist zunächst diskret und uncharakteristisch mit Leistungseinschränkung und Belastungsdyspnoe, Schwindel, Sinustachykardien, leichter Zyanose oder Brustschmerzen. Im Endzustand findet sich ein Cor pulmonale und ggf. alle Zeichen der Rechtsherzdekompensation (Stauung von Halsvenen und Leber, Ödeme). Der Schweregrad der pulmonalen Hypertonie wird nach dem mittlerem pulmonal-arteriellen Druck (mPAP) in Ruhe in drei Kategorien eingeteilt: Bei einem Druck von 20-

25mmHg spricht man von einer latenten, ab 25mmHg von einer manifesten und ab 40mmHg von einer schweren pulmonalen Hypertonie. Die Prognose korreliert sehr eng mit dem mPAP, so beträgt bei einem Wert von >30mmHg die 5-Jahres-Überlebensrate ca. 30%, bei über 50mmHg nur ca. 10%. Bei der IPAH finden sich in der Regel verhältnismäßig hohe Druckwerte, dementsprechend ist hier die Prognose besonders ungünstig.⁵

1.2 Hypoxie und pulmonale Hypertonie

Die Wand einer Arterie besteht aus drei Schichten: Innen liegt die Tunica intima (Intima), welche aus Endothelzellen, subendotheliale Bindegewebe und der sich aus elastischen Faserbündeln aufbauenden Lamina elastica interna besteht. Letztere bildet die Grenze zur Tunica media (Media) mit vielen glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMCs) und Bindegewebefasern. Die äußere Tunica adventitia (Adventitia) besteht aus längs verlaufenden Kollagenfibrillen, elastischen Fasern und Fibroblasten. Der Übergang zum die Arterie umgebenden lockeren Bindegewebe ist dabei fließend. Es existieren drei Typen von Arterien: Die großen, herznahen Arterien vom elastischen Typ, die Arterien vom muskulären Typ und die Arteriolen. Der erste Abschnitt der Pulmonalarterie ist vom elastischen Typ, d.h. es gibt zusätzlich zahlreiche Elastinlamellen in der Arterienwand, welche die Dehnbarkeit und die elastischen Rückstellkräfte ermöglichen und damit einen gleichmäßigen Blutfluss in Systole und Diastole gewährleisten (sog. Windkesselfunktion). Ein weiteres Merkmal der Arterien vom elastischen Typ ist die Ernährung der äußeren Anteile des Gefäßes durch dort verlaufende Versorgungsgefäße (sog. Vasa vasorum). Die mittelgroßen und kleinen Arterien vom muskulären Typ gehen fließend aus den Arterien vom elastischen Typ hervor und zeichnen sich durch eine muskelzellreiche Media aus. Arteriolen besitzen einen Durchmesser von 20-120µm und lediglich ein bis zwei Muskelzellschichten. Ihre besondere Bedeutung liegt in der Funktion als letztes präkapilläres Widerstandsgefäß.⁶

Die biologische Reaktion der Pulmonalarterien auf chronische Hypoxie muss also im Zusammenhang mit dem jeweiligem Arterientyp betrachtet werden, da diese die Summe der Reaktionen der unterschiedlichen Zelltypen darstellt. Daneben kommt es durch die Hypoxie zu einer Entzündungsantwort, welche über einwandernde, zirkulierende Zellen ebenfalls den Gefäßumbau beeinflusst.⁷

Die Idee, dass alveoläre Hypoxie alleine beim Menschen vaskuläre Umbauprozesse (Remodelling) verursachen kann, die in eine pulmonale Hypertonie münden kann, beruht auf mehreren Beobachtungen. So haben Menschen, die in großer Höhe über dem Meeresspiegel leben einen chronisch erhöhten pulmonal-arteriellen Druck und eine erhöhte Druckzunahme bei körperlicher Arbeit. In deren Lungen findet man korrespon-

dierend zum erhöhten Druck eine Vermehrung von α -*smooth-muscle actin* in kleinen Pulmonalarterien und eine Verdickung von Media und Adventitia in großen Gefäßen.⁸ Auch die zunehmende Exposition in immer größere Höhen führt zum signifikanten Anstieg des pulmonal-arteriellen Druckes und dem Verlust der spontanen Reversibilität dieser Druckerhöhung auf die Applikation von 100% Sauerstoff.^{9,10} Verschiedene Tierarten entwickeln als Reaktion auf chronische Hypoxie eine pulmonale Hypertonie in unterschiedlichen Ausprägungen bezogen auf Schweregrad und Lokalisation des Gefäßumbaus abhängig von Alter und Geschlecht. So ist in großen Pulmonalarterien bei Ratten und Mäusen vor allem ein adventitielles Remodelling mit frühen Syntheseprozessen in Fibroblasten zu beobachten, während z.B. bei Rindern und Schweinen vor allem eine Proliferation der Media stattfindet.⁷ In distalen muskulären Pulmonalarterien findet dagegen in erster Linie eine Hypertrophie der Media statt, welche unter anderem mit der Einwanderung von hypoxieaktivierten Fibroblasten und Myofibroblasten und zirkulierenden Vorläuferzellen zusammenhängt.¹¹⁻¹³ Auch in den kleinsten Pulmonalarterien beobachtet man eine durch verschiedene Prozesse verursachte Muskularisierung der eigentlich muskelfreien Gefäße.⁷

Die Adventitia der Pulmonalarterie spielt insgesamt eine besondere Rolle, da hier besonders früh auf Zellstress z.B. in Form von Hypoxie reagiert wird. Die Fibroblasten als wesentlicher Zellbestandteil der Adventitia, bzw. bestimmte Subpopulationen hiervon, erfüllen vermutlich mehrere unterschiedliche Funktionen¹⁴:

- Proliferation als Reaktion auf Gefäßverletzung oder zellulären Stress
- Differenzierung in Myofibroblasten
- Erhöhung und Veränderung der Bestandteile der Produktion extrazellulärer Matrix
- parakrine Stimulation von SMCs und Endothelzellen
- Rekrutierung zirkulierender Leukozyten
- Produktion angiogenetischer Faktoren

Aufgrund dieser vielfältigen Funktionen wurden die adventitiellen Fibroblasten in dieser Arbeit als Modellzelle für die Inkubation unter Hypoxie ausgesucht, um deren Beteiligung an der Antwort der Pulmonalarterie auf Hypoxie auf miRNA-Ebene zu analysieren.

1.3 Regulation des Zellstoffwechsels und der Zelldifferenzierung

Die Proteinbiosynthese beginnt zunächst mit der Transkription. Hierbei wird im Zellkern ein Gen aus der DNA durch die RNA-Polymerase in eine Messenger-RNA (mRNA) transkribiert und diese in das Zytosol transportiert. Aus der mRNA wird im Rahmen der Translation der genetische Code in ein Protein übersetzt, welches im Ribosom durch die Verkettung von Aminosäuren entsteht. Eine Sequenz von drei Basen, ein sog. Triplett, codiert dabei für ein Startcodon als Anfangspunkt der Translation, eine spezifische Aminosäure oder ein Stoppcodon als Endpunkt der Translation. Die Regulation dieser Prozesse ist auf jeder Ebene der Proteinbiosynthese möglich und vielfältig. An dieser Stelle soll insbesondere die posttranskriptionale Regulation betrachtet werden, da hier auch der inhaltliche Schwerpunkt dieser Arbeit liegt.

Die transkribierte mRNA wird zunächst in drei Schritten modifiziert. Im Rahmen des *Capping* wird am 5'-Ende ein methylierter Guanylrest angehängt. Am 3'-Ende werden an die mRNA als weiteres Erkennungsmerkmal Poly-A-Sequenzen synthetisiert (Poly-Adenylierung). Diese beiden Schritte dienen zum Schutz vor Abbau durch Exonukleasen, die 5'-Kappe zudem zur Initiation der Translation. Durch das Spleißen (*splicing*) werden nichtkodierende Sequenzen (Introns) aus den codierenden Sequenzen (Exons) entfernt. Durch alternatives Spleißen können dabei unterschiedliche Exons ausgewählt werden und aus einem Gen verschiedene Proteine entstehen.

Eine andere wichtige Form der posttranskriptionalen Regulation ist die Beeinflussung der Translation und Stabilität von mRNAs durch kurze RNAs (*RNA-Silencing*). Hierfür existieren zwei wichtige Mechanismen: Die Anlagerung von komplementären *short interfering RNAs* (siRNAs) an mRNA-Abschnitten und die dortige Spaltung mit folgendem Abbau der Fragmente (RNA-Interferenz) und die Blockade der Translation und ggf. die Einleitung des mRNA-Abbaus durch *micro-RNAs* (miRNAs).¹⁵

1.4 Micro-RNAs

Micro-RNAs (miRNAs) sind einsträngige, nichtcodierende RNAs mit einer Länge von 18-29 Nukleotiden.¹⁶ Entdeckt wurden miRNAs Anfang der 1980er Jahre in Versuchen mit dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*. Dort wurde beobachtet, dass es sich bei dem Genprodukt des Gens *lin-4* nicht um ein Protein handelt, sondern um zwei RNAs mit 60 bzw. 20 Nukleotiden Länge, welche, komplementär zu der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der mRNA des Gens *lin-14*, durch Basenpaarung deren Translation supprimieren und damit die synthetisierte Menge des Proteins reduzieren konnten. Durch verschiedene weitere Versuche konnte ein modulatorischer Ein-

fluss der Genregulation von *lin-4* auf die postembryonale Entwicklung des Nematoden nachgewiesen werden.¹⁷⁻²⁰ Erst im Jahr 2000 wurde das zweite Gen in *C. elegans* mit ähnlichen Eigenschaften wie *lin-4* entdeckt: *let-7*. Auch hier konnte eine entwicklungsmodulierende Funktion nachgewiesen werden, außerdem das Vorkommen homologer Gene für *let-7* in *Drosophila melanogaster* und *Homo sapiens*.^{21,22} Seitdem ist die Anzahl entdeckter miRNAs steil angestiegen, miRBase V.18.0 zählt 18226 Einträge für alle Organismen, davon 1527 für den Menschen.²³ Auch in Pflanzen konnten miRNAs nachgewiesen werden.²⁴

1.4.1 Synthese, Wirkmechanismen und Funktion

Die Synthese einer miRNA geht von einem entsprechenden Gen aus. Die Lokalisierung der miRNA-Gene innerhalb des Genoms ist unterschiedlich: Manche miRNAs liegen intra-, manche extragenisch. Dabei kommen sowohl örtlich völlig isolierte miRNAs vor als auch nebeneinanderliegende, koexprimierte Gruppen.¹⁶ Aus dem Gen wird zunächst durch die RNA-Polymerase II (in Ausnahmefällen durch die RNA-Polymerase III²⁵) eine pri-miRNA (primäre miRNA) transkribiert, welche sich in Haarnadelstrukturen zusammenfaltet und mit Hilfe der Endonukleasen vom RNase III-Typ *Dicer* und *Drosha* weiter prozessiert wird.

Drosha bildet in Säugetieren einen Komplex mit dem Protein DGCR8 (*DiGeorge Critical Region Gene 8*), welcher die pri-miRNA zur pre-miRNA (*precursor-miRNA*) mit etwa 70nt Länge umwandelt.²⁶⁻²⁸ Liegt das miRNA-Gen im Intron eines Protein-codierenden Gens, entsteht die pre-miRNA durch Spleißen (*splicing*) aus dem Primärtranskript.

Pre-miRNAs werden bei Tieren durch Exportin-5 aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert und dort von *Dicer* im Komplex mit dem TAR-RNA-Bindeprotein (TRBP) in etwa 20bp lange, doppelsträngige miRNAs geschnitten. Ein Strang bildet die fertige miRNA, der andere wird in der Regel degradiert. Gelegentlich können auch aus beiden Strängen miRNAs entstehen.²⁹ Eine Zusammenfassung der Biosynthese zeigt die Abbildung 1.1.

MiRNAs spielen eine wichtige Rolle in vielen biologischen Prozessen. Die Kontrolle der Genexpression durch miRNAs erfolgt durch posttranskriptionelle Mechanismen. Dabei ist die Bildung von micro-RNA-induzierten-*silencing*-Komplexen (miRISC) ein wichtiger Schritt (siehe auch Abbildung 1.1). Hierbei lagern sich miRNAs mit Proteinen der Argonaut-Familie (Ago-Proteine) zusammen, um so einen erhöhten Umsatz (mRNA-Destabilisierung) und eine reduzierte Translation (translationale Repression) der Ziel-mRNA zu bewirken. Der genaue Wirkmechanismus der Ago-Proteine ist dabei immernoch unklar³⁰, das Verhältnis zwischen Destabilisierung und Repression ebenso.

Einleitung

Die Destabilisierung ist jedoch bei fast allen Zielgenen auf mRNA-Ebene messbar, so dass die Aktivität einer miRNA hier in der Regel wider gespiegelt wird.^{31,32}

Zur Involvierung von miRNAs in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen existieren verschiedene Konzepte³³:

1. Element einer Signalkette: Die miRNA wird durch ein Signal hoch- oder herunterreguliert und löst so den Effekt (Destabilisierung / Verhinderung der Translation) an der Ziel-mRNA aus.
2. Signal-Modulation: Ziel der miRNA ist ein wichtiges Element aus einem Signalweg, durch Regulation der miRNA wird die Signalantwort moduliert.
3. Negatives Feedback: Die miRNA wird von einem Signalweg induziert und blockiert ein Element des Signalwegs.
4. Positives Feedback: Die miRNA wird von einem Signalweg induziert und blockiert negative Regulatoren des Signalwegs.
5. Pufferfunktion: Die miRNA blockiert sowohl negative als auch positive Regulatoren.

Eine perfekte komplementäre Basenpaarung zwischen mRNA und miRNA kommt fast ausschließlich bei Pflanzen vor. Bei Wirbeltieren dagegen ist eine nicht-perfekte Basenpaarung die Regel. Hierfür ist die sog. *seed*-Region der miRNA zwischen Nukleotid 2 und 8 von besonderer Bedeutung, da eine perfekte Basenpaarung in genau dieser Region die wichtigste Voraussetzung für die miRNA-mRNA Bindung darstellt. Die der *seed*-Region entsprechenden Bindungsstellen der mRNA liegen in der Regel im 3'-UTR und sind in mehrfachen Kopien vorhanden. Durch diese Art der Bindung und die Kürze der dafür notwendigen komplementären Basensequenz kann erklärt werden, wie eine miRNA viele verschiedene Gene bzw. ganze Gengruppen gleichzeitig regulieren kann und warum generell so viele Gene potentiell durch miRNAs reguliert werden.³⁴⁻³⁶

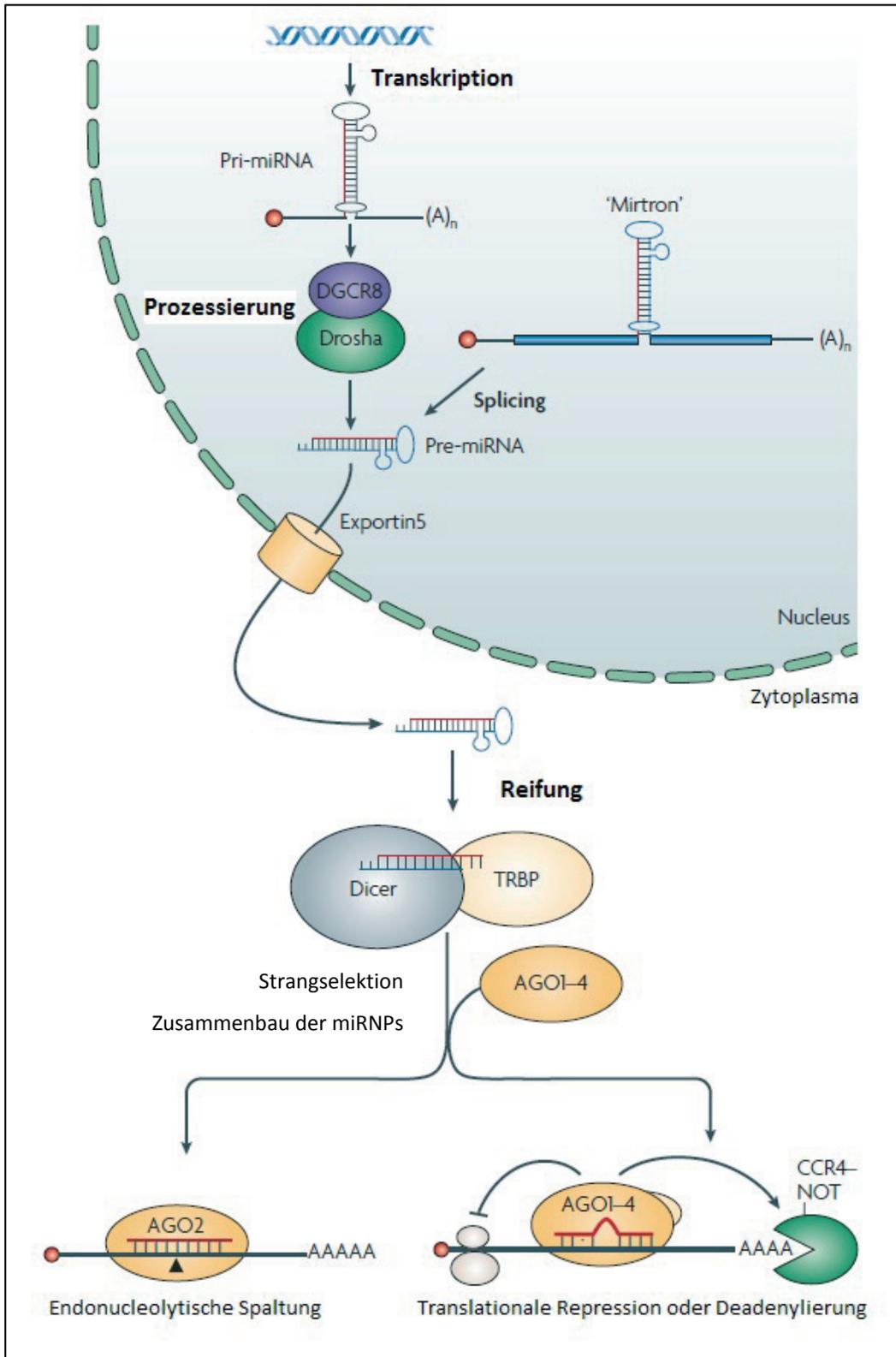


Abbildung 1.1 miRNA Synthese und Zusammenbau in mikro-Ribonucleoproteine

adaptiert nach Filipowicz et al. ²⁹

1.4.2 Nomenklatur

Im Jahr 2003 wurde erstmals eine einheitliche Nomenklatur und Definition für miRNAs festgelegt.³⁷

Demnach kann ein kurzes RNA-Molekül als miRNA definiert werden, wenn es bestimmte Kriterien der Expression (Detektion einer 22nt RNA durch Hybridisierung, z.B. *Northern Blot* und/oder Identifikation einer 22nt Sequenz in nach Größe fraktionierter RNA) und der Biogenese (Detektion einer pre-miRNA, welche die 22nt miRNA Sequenz enthält und/oder phylogentische Konservierung und/oder Akkumulation der pre-miRNA bei reduzierter *Dicer*-Funktion) erfüllt.

Die Benennung der miRNAs erfolgt mit dem Präfix „miR-“, gefolgt von einer Identifizierungsnummer (z.B. „miR-21“). Die einzige Ausnahme hierfür bilden die *let*- und *lin*-miRNAs. Identische und fast identische (Unterschied 1 Nukleotid) miRNAs unterschiedlicher Organismen haben die gleiche Nummer. Werden innerhalb des Organismus identische miRNAs an unterschiedlichen Genorten exprimiert, werden die Transkripte fortlaufend gezählt (z.B. „miR-23-1“, „miR-23-2“). Diese sind nur anhand der pre-miRNA-Sequenzen zu unterscheiden. Sehr ähnliche miRNAs werden mit zusätzlichen Buchstaben versehen (z.B. „miR-29a“, „miR-29b“). Gelegentlich stammen zwei miRNAs von einem Vorläufer ab: Sollte hierbei das Hauptprodukt identifiziert sein, wird das Nebenprodukt mit einem „*“ versehen. Ist jedoch unklar, welche miRNA Haupt- und welche Nebenprodukt ist, werden die miRNAs zunächst „-3p“ (vom 3'-Arm des Vorläufers) oder „-5p“ (vom 5'-Arm des Vorläufers) benannt (z.B. „miR-296-3p“ und „miR-26-5p“). Um eine miRNA einem Organismus zuzuordnen, wird dieser in lateinischer Sprache abgekürzt oder ausgeschrieben vorangestellt (z.B. „*hsa*-miR-21“ oder „*homo sapiens* miR-21“).³⁷⁻⁴¹

1.4.3 Identifikation von miRNA-Zielgenen

Bis eine miRNA der Regulation eines bestimmten Gens zugeordnet werden kann, ist eine Vielzahl von Experimenten notwendig. Nach der Expressionsanalyse mittels Microarray oder PCR und der Validierung der erhaltenen Ergebnisse können miR-*Knockout*-Studien oder das *Silencing* von miRNAs mit Antagomirs⁴² (verhindern *in vivo* die miRNA-mRNA-Bindung im miRISC⁴³) oder komplementären *Locked Nucleic Acid* (LNA) Oligonukleotiden (Bildung von starken LNA-miRNA Bindungen *in vivo* und *in vitro*⁴⁴) Hinweise auf die Funktion und Ziel-mRNAs der untersuchten miRNA geben. Aufgrund der Redundanz vieler miRNAs, der in der Regel subtilen Regulation der Translation der Zielgen-Transkripte (meist < 2-fach) und der durch die *seed*-Bindung vielen möglichen Ziele ergeben sich hierbei jedoch einige Schwierigkeiten.³³ Der An-

schluss von mRNA-Microarrays kann an dieser Stelle auch nur eingeschränkt weiterhelfen, da nur durch miRNAs degradierte mRNAs quantitativ erfasst werden, die translationale Repression jedoch außen vor bleibt. Auch bei anderen Screening-Methoden ergeben sich vielfältige Schwierigkeiten.⁴⁵

Die direkte Validierung von miRNA-Zielgenen erfolgt daher in der Regel über die Quantifizierung eines Reporters (z.B. Luciferase) im 3'-UTR nach der Transfektion einer Zelle mit der entsprechenden miRNA^{46,47} oder durch Real-Time-PCR der Ziel-mRNA.⁴⁵

Eine Orientierung über potentielle Zielgene geben bioinformatische Algorithmen, die anhand verschiedener Analysemethoden die in der Regel Bindung der *seed*-Region der miRNA im 3'-UTR der mRNA vorherzusagen versuchen.^{40,48-52} Da jeder dieser Algorithmen mit unterschiedlicher Aussagekraft meist mehrere hundert Zielgene ermittelt, hat sich in der Praxis etabliert, die Schnittmenge der Ergebnisse mehrerer Algorithmen für die Zielgenanalyse zu benutzen.¹ Eine Sonderstellung nimmt die Datenbank TarBase ein, in welcher nur experimentell validierte Ziele eingepflegt sind.^{53,54}

1.4.4 Hypoxie, pulmonale Hypertonie und klinische Anwendungen

Die biologische Funktion und Wirkungsweise von miRNAs als regulatorisches Element in verschiedensten zellulären Prozessen macht eine ebenfalls zentrale Bedeutung in vielen Krankheitsprozessen naheliegend. Entsprechend ihres ubiquitären Vorkommens in allen Zellen des Körpers, der großen Zahl unterschiedliche miRNAs und der breiten kommerziellen Verfügbarkeit von miRNA-Analysewerkzeugen, wurden bereits für viele Krankheiten und pathophysiologische Prozesse Veränderungen in der miRNA-Expression beschrieben, so z.B. für metabolische⁵⁵ und psychiatrische^{56,57} Erkrankungen, Leber- und Gallenwegserkrankungen^{58,59} und auch für Lungenerkrankungen.^{60,61} Dabei zielt die miRNA-Forschung neben besserem Verständnis epigenetischer Prozess vor allem auf zwei klinische Anwendungen ab:

1. Die Verwendung von miRNAs oder miRNA-Expressionsprofilen als Biomarker für Diagnostik und Prognostik von Krankheiten / Tumoren⁶²⁻⁶⁵
2. Identifizierung von spezifischen miRNAs als Ansatzpunkte für therapeutische Interventionen zur Blockade krankheitsfördernder oder pathogenetischer Prozesse⁶⁶⁻⁷⁰

Im Rahmen der Tumorforschung wurden bereits mehrere hypoxie-regulierte miRNAs identifiziert.⁷¹ Auch für die Pathogenese der pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH) gibt es einige Evidenz für eine substantielle Beteiligung von miRNAs im pulmonal-vaskulären Remodeling-Prozess. So sind im Rattenmodell sowohl bei der Monocrotalin- als auch bei der hypoxieinduzierten PAH eine Reihe von teilweise unterschiedli-

chen miRNAs dysreguliert.⁷² In den pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen (PAS-MCs) von PAH-Patienten und Mäusen mit PAH konnten erniedrigte Spiegel für miR-204 nachgewiesen werden, und dass die pulmonale Supplementierung von miR-204 im Mausmodell die Schwere der Krankheit reduziert.⁷³ Auch das bei familiärer PAH mutierte, und bei experimenteller PAH reduzierte BMPR2 wird wahrscheinlich durch miRNAs reguliert. So wird im Zellmodell durch die Induktion des miR17/92-*clusters* mit Interleukin-6 über den *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3)-Signalweg die Expression von BMPR2 reduziert⁷⁴ und durch die Inhibition von miR-17 die Herz-Lungen-Funktion in der experimentellen PAH bei Nagern verbessert.⁷⁵

1.5 Microarrays

Zum Screening von miRNAs, die möglicherweise eine Rolle bei der zellulären Adaptation von Pulmonalarterien auf Hypoxie spielen, bietet sich die Microarray-Technologie an. Die Entwicklung von Microarrays begann Anfang der 1990er Jahre als Reaktion auf die Herausforderung, zunehmende Anzahlen von Genen und Proteinen im Kontext komplexerer Systeme betrachten zu können.^{76,77} Unterschiedliche Arten von Microarrays haben sich seitdem für verschiedene Anwendungen der Analyse von Proteinen, Nukleinsäuren und kleinen Molekülen (z.B. Medikamente, Lipide) als Standardplattform etabliert. Diese Tatsache lässt sich anhand gleich mehrerer Vorteile begründen: Zunächst wird für eine große Menge Informationen eine vergleichsweise kleine Menge Probenmaterial benötigt. Des Weiteren sind Microarrays, einmal produziert, leicht zu lagern und erneut herzustellen. Durch die weitgehend automatisierbare und gut strukturierbare Durchführung können außerdem mehrere Experimente parallel und schnell durchgeführt werden.⁷⁸

Die in dieser Arbeit verwendeten Microarrays sind ausschließlich auf die Analyse von Nukleinsäuren ausgelegte DNA-Microarrays. Diese haben mittlerweile durch die Möglichkeit, bis hin zum gesamten Genom die Expressionsprofile einer biologischen Probe beobachten zu können, eine wichtige Rolle zur Analyse biologischer Interaktionen eingenommen. Auch für die aufkommende wissenschaftliche Auseinandersetzung mit den – in vieler Hinsicht noch unbekannt – miRNAs spielen Microarrays eine entscheidende Rolle, um die Regulation bestimmter miRNAs biologischen Prozessen wie Krankheit, Entwicklung, Homoöstase etc. zuzuordnen zu können und so Ansatzpunkte und Hypothesen für die detaillierte Erforschung einer miRNA und abhängiger Gene zu liefern.

1.5.1 Aufbau

Der Aufbau eines Microarrays besteht minimal aus drei Schichten: Man benötigt eine Basis, welche mit einer Oberfläche beschichtet sein muss, auf die die Sonden gebunden werden können. Für DNA-Microarrays wird als Basis in der Regel ein Glasobjektträger oder eine Silikonmembran benutzt. Die Oberfläche dagegen kann sehr unterschiedlich gewählt werden, so sind z.B. Aminogruppen, aktivierte Ester, Aldehyde oder Isocyanate mögliche Oberflächen, um Sonden aus Nukleinsäuren daran kovalent zu binden.⁷⁸ Die Sonden werden maschinell in einem bestimmten Raster als Punkte (*spots*) auf dem Objektträger verankert (sog. „*spotted* Microarrays“) und die Zuordnung der Lokalisation zu den entsprechenden Sonden bzw. deren Bindungspartnern in einer Datei gespeichert (sog. *gene array list*). Alternativ können die Sonden direkt auf den Objektträger synthetisiert werden (sog. „Oligonukleotid-Microarrays“). Die Bindung des gesuchten Moleküls an der Sonde erfolgt durch komplementäre Basenpaarung. Es existieren einige unterschiedliche Sondentypen, auf die hier verwendet wird im Material und Methoden-Teil gesondert eingegangen (siehe Kapitel 2.7.1).

1.5.2 Ablauf eines Microarray-Experiments zur Untersuchung von RNA-Proben

Ein Microarray muss zunächst nach der Kompatibilität zur gewünschten Anwendung und nach der vorhandenen Laborgrundausrüstung ausgesucht werden, da für verschiedenste Anwendungen unterschiedlichste Plattformen kommerziell erhältlich sind. Aufgrund der verhältnismäßig hohen Kosten einzelner Versuche, muss eine Versuchsreihe sorgfältig im Kontext geplant werden und die zu benötigende Anzahl Microarrays für eine Fragestellung vorher festgelegt werden. Hieran sollte sich die Aufarbeitung der zu untersuchenden Proben eng orientieren, damit die sehr unterschiedlichen Mengen an Ausgangsmaterial (z.B. 2µg RNA empfohlen für ein miChip Microarray, ab 5pg RNA für eine Agilent 4x44k Whole Genome Human Microarray mit Präamplifikation) zur Verfügung stehen.

Stehen die Proben in ausreichender Quantität zur Verfügung, sollte die Qualität einer Probe analysiert werden. Wichtige Kriterien sind die Reinheit der Nukleinsäuren in der Probe und der Degradationsgrad der RNA, da degradierte RNA den Ergebnissen eines Microarrays eine deutliche Streuung hinzufügen kann.⁷⁹ Die Reinheit der Nukleinsäuren kann zusammen mit der quantitativen Messung spektrometrisch gemessen werden. Eine etablierte Methode zur Beurteilung des Degradationsgrades einer Probe stellt die Kapillarelektrophorese dar, welche mit geringen Mengen RNA eine zuverlässige Aussage darüber treffen kann. Dabei wird eine RNA-Integrity-Number (RIN) be-

Einleitung

rechnet, welche die ansonsten lediglich ungenau anhand des Elektrophoresebildes erkennbare Degradation in eine klare Zahl fasst.⁸⁰ Verschiedene Autoren empfehlen eine RIN ≥ 8 als Voraussetzung für die Hybridisierung einer Probe.^{81,82}

Ist die RNA-Probe als geeignet charakterisiert worden, erfolgt bei DNA-Microarrays über eine cDNA-Synthese und cRNA-Synthese die Markierung mit einem Farbstoff,

das sog. Labelling. Hierfür werden die Cyanin-Farbstoffe 3 und 5 verwendet, die enzymatisch an die RNA gekoppelt werden können. Bei miRNA-Microarrays wird der an ein Oligonukleotid gekoppelte Farbstoff direkt an die miRNAs ligiert.⁸¹

Die farbmarkierten Proben können nun auf eine Microarray appliziert und bei einer bestimmten Temperatur über eine bestimmte Zeit hybridisiert werden. Sowohl Temperatur, als auch die Zeit sind in der Regel spezifisch für das verwendete Microarray.

Der letzte Schritt im experimentellen Aufbau stellt das Abwaschen nicht und unspezifisch gebundener RNA und Farbstoffe dar. Hierfür werden Waschpuffer in verschiedenen Konzentrationen von Detergenzien und Salzen verwendet. Auch dieser Schritt ist arrayspezifisch. Im Anschluss an das Waschen kann das Microarray mit einem geeigneten Scanner gescannt werden. Zur Zuordnung der *spot*-Positionen zu einer bestimmten Nukleinsäuresequenz werden fertige *gene array lists* (*.gal-Dateien) benutzt, in welchen der jeweilige Hersteller die notwendigen Angaben hinterlegt hat. Diese Liste muss mit der Bildinformation gepaart werden (*gridding*). Die letztendliche Datenanalyse ist komplex und besteht aus mehreren Schritten. Hierauf wird im Teil „Materialien- und Methoden“ und „Ergebnisse“ explizit eingegangen. Eine Zusammenfassung des Arbeits-

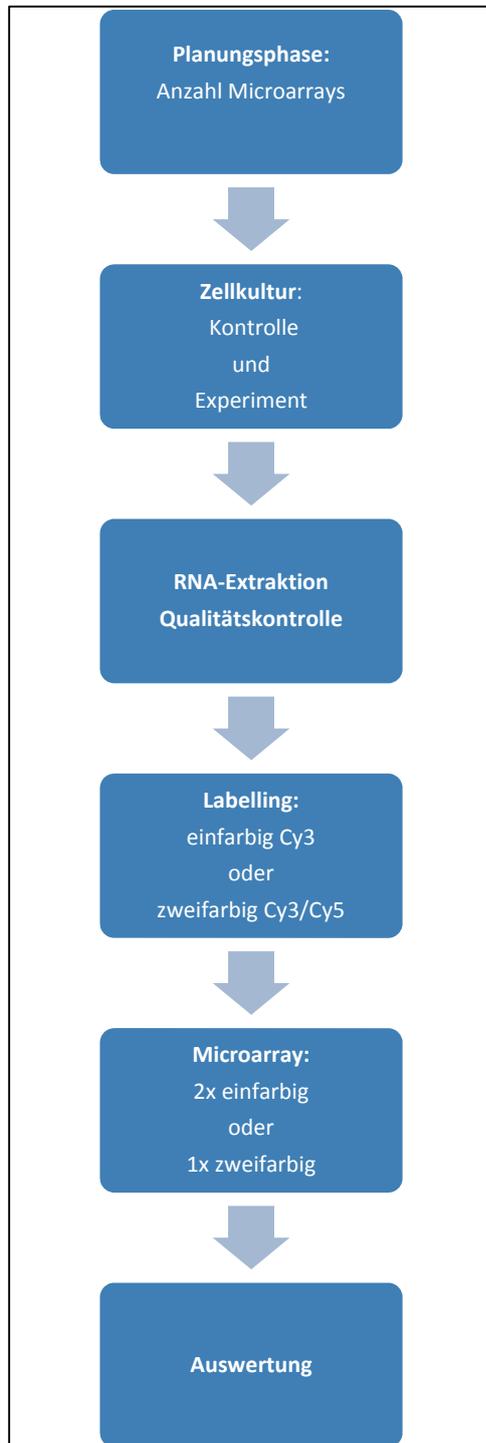


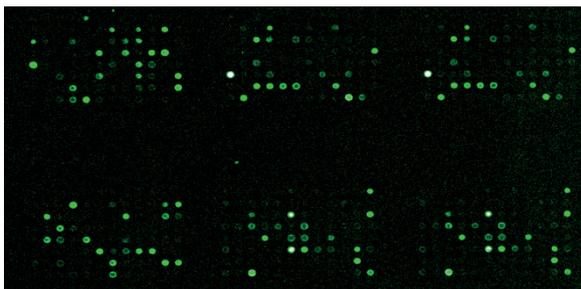
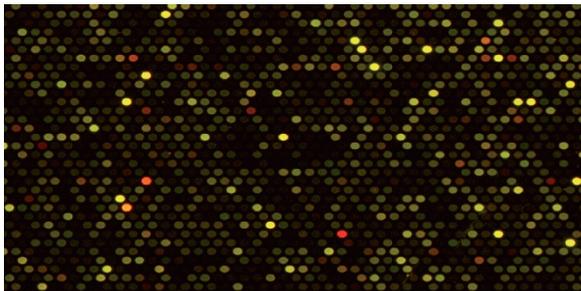
Abbildung 1.2 Arbeitsdiagramm
Microarray

ablaufes zeigt Abbildung 1.2. In Abbildung 1.3 sind die Bildinformationen hybridisierter und ausgelesener Microarrays beispielhaft dargestellt.

1.6 Ziele dieser Arbeit

Das Hauptziel dieser Arbeit stellte die Etablierung einer robusten miRNA-Microarray-Plattform dar, die in der Ausführung maximal synergistisch zu den bereits vielfach in der Arbeitsgruppe verwendeten Agilent mRNA-Microarrays ist, um bereits vorhandene Geräte und Materialien bestmöglich nutzen zu können. Dazu gehörte nicht nur die Entwicklung eines standardisierten experimentellen Ablaufs, sondern auch die Entwicklung einer dazugehörigen Auswertungsprozedur auf Basis des Programms R. Dies sollte eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleisten, um die miRNA-Microarrays als standardisiert verfügbare Methode für verschiedene Fragestellungen schnell und einfach praktikabel zu machen.

Im Rahmen der Etablierung sollten durch die Anwendung von humanen Pulmonalarterienfibroblasten als Zellmaterial und deren Inkubation unter Hypoxie die Regulation von miRNAs in dieser experimentellen Umgebung untersucht werden, um so eventuelle



Ansatzpunkte für die weitere Forschung des vaskulären Remodelings der Adventitia von Pulmonalarterien im Rahmen einer pulmonalen Hypertonie auf miRNA-Ebene identifizieren zu können.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe experimentelle Kardiologie der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim sollte zudem als zweite praktische Anwendung der etablierten Plattform ein Infarkt-Reperusionsmodell im Maus-Myokard auf miRNA-Expressionsänderungen untersucht werden.

Abbildung 1.3 Zweifarbiges (oben) und Einfarbiges (unten) Microarray

Die zweifarbige Hybridisierung der Farbstoffe Cy3 (grün) und Cy5 (rot) ergibt in der Überlagerung gelb (oben). Im Intensitätsmaximum erscheint der Punkt weiß (unten).

2 Materialien und Methoden

2.1 Zellen

2.1.1 Humane Lungenfibroblasten

2.1.1.1 Allgemeines / Ethik

Bei den verwendeten humanen Lungenfibroblasten handelt es sich z.T. um interstitielle, z.T. um Fibroblasten aus der Adventitia der Pulmonalarterie. Die zur Zellisolation verwendeten Lungen wurden in der Universitätsklinik für Chirurgie, Klinische Abteilung für Herz- und Thoraxchirurgie, am Allgemeinen Krankenhaus in Wien explantiert und dann teils in Paraformaldehyd fixiert, teils in flüssigem Stickstoff kryokonserviert nach Gießen transportiert. Hier wurden die Lungen u.a. für die Zellisolation präpariert. Anhand der Begutachtung am Institut für Pathologie in Gießen und des begleitenden Arztbriefes aus Wien wurde eine Diagnose gestellt. Die in dieser Arbeit verwendeten Fibroblasten stammen aus gesunden, potentiellen Spenderlungen, welche jedoch nicht transplantiert werden konnten.

Die interstitiellen Fibroblasten ersetzen in den Vorversuchen die Pulmonalarterienfibroblasten, da diese aufgrund der komplizierteren Isolation nur für den Hauptversuch verwendet wurden.

Diese Form der Zellgewinnung wurde bereits in vorangegangenen Versuchen der Gießener pulmologischen Forschungsgruppen genutzt und nicht separat für diese Arbeit etabliert. Die Verwendung der Lungenfibroblasten ist durch die Voten 31/93 und 29/01 der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Universität Gießen, sowie das Votum der Ethikkommission des Allgemeinen Krankenhauses Wien 076/2009 abgedeckt.

2.1.1.2 Isolation adventitieller Fibroblasten aus der pulmonalarteriellen Strombahn

Zunächst wird die Pulmonalarterie gründlich mit phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS) gespült und eventuell anhaftende Blut- und Gewebereste sorgfältig entfernt. Dann wird die Arterie der Länge nach aufgeschnitten, das Endothel mit einer Pinzette abgeschabt und die Tunica media mit einem Skalpell abgezogen. Wenn diese komplett entfernt ist, wird die Adventitia erneut mit PBS gespült und anschließend manuell zerkleinert. Das PBS wird durch 16ml SMC-Medium ersetzt und die entstandene Suspension auf Zellkulturflaschen aufgeteilt (1,5ml pro T25-Flasche, 4,5ml pro T75 Flasche)

und eine Woche kultiviert. Erst dann wird das Medium gewechselt und dabei die Zellschale nach Zelltypen gemustert. Sobald die Zellen dichter gewachsen sind, werden sie trypsiniert (siehe 2.1.4.1) und auf einer 10cm Zellschale in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) ausgesät. Später wird 1:5 passagiert und die Zellen werden eingefroren. Die dann für die Versuchsreihen aufgetauten Zellen sind dementsprechend in der dritten Passage.

2.1.1.3 Isolation interstitieller Fibroblasten aus Lungengewebe

Ein würfelförmiges Lungengewebsstück wird zu Beginn mit DPBS gespült, Pleura visceralis, Gefäße und Fett werden dabei manuell entfernt. Das Gewebe wird wie bei der Isolation adventitieller Fibroblasten in DPBS zerkleinert und das DPBS im Folgenden durch 16ml SMC-Medium ersetzt. Das restliche Vorgehen erfolgt entsprechend. Auch die aufgetauten interstitiellen Fibroblasten sind demzufolge in der dritten Passage.

Zur Qualitätskontrolle werden die einzufrierenden Zellen auf fibroblastenspezifische Transkripte wie Kollagen I, von-Willebrand-Faktor, glattes Muskelzell-Aktin und Cytokeratin getestet.

2.1.2 Maus-Kardiomyozyten

Die Microarray-Versuchsreihe mit Maus-Kardiomyozyten wurde als Kooperationsprojekt mit dem Franz-Groedel-Institut der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim durchgeführt. Dort wurde am offenen Herzen mit Hilfe einer Klemme ein künstlicher Infarkt verursacht, der in einer Gruppe nach 30min durch Öffnen der Klemme reperfundiert, in der anderen Gruppe belassen wurde. Isoliert wurden im Folgenden Zellen aus dem Infarktareal. Verwendet wurde die bereits mit der Phenol-/Guanidin-Methode extrahierte RNA.

2.1.3 NIH / 3T3-Zellen

Bei diesen Zellen handelt es sich um eine 1969 von Jainchill et. al⁸³ etablierte unsterbliche Linie embryonaler Fibroblasten der Maus, welche weit verbreitet und kommerziell erhältlich ist. Aufgrund ihrer Verfügbarkeit und Robustheit wurden diese Zellen insbesondere für die Etablierung der Methode benutzt.

2.1.4 Kultur

2.1.4.1 Allgemeines

Als Basismedium für die Zellkultur wurde *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)* verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Standardmedium zur Kultivierung verschiedener tierischer Zellen. Die Zellen wurden bei 37°C, 16% O₂ und 5% CO₂ inkubiert.

Zur Versorgung mit Wachstumsfaktoren wurden dem Zellmedium 10% (v/v) *Fetal Bovine Serum* zugesetzt.

Als Antibiotikaprophylaxe diente eine Kombination aus Penicillin/Streptomycin, welche als Konzentrat dem Zellmedium zu 1% (v/v) beigemischt wird. Das Wirkspektrum des Antibiotikums umfasst sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien.

Zur weiteren Vermehrung werden dicht mit Zellen bewachsene Zellschalen gesplittet. Dazu wird unter sterilen Bedingungen das Kulturmedium entfernt, der Zellrasen gründlich mit DPBS gewaschen, und dann mit 3ml einer 1x Trypsin/EDTA Lösung (Stammlösung 10x, verdünnt mit DPBS) 3min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle wird die Adhäsionslyse mit 7ml DMEM Zellmedium gestoppt, mit der Pipette vorsichtig durchmischt, je 2,5ml auf 4 Zellschalen verteilt und jeweils mit DMEM auf 7ml aufgefüllt. Dann werden die Zellen weiter im Brutschrank inkubiert.

2.1.4.2 Normoxie

Normoxische Bedingungen sind für eine menschliche Lungenzelle physiologisch und werden daher als Referenz zum pathologischen Zustand der Hypoxie verwendet. Hierfür verbleiben die Zellen im Inkubator bei 37°C, 16% O₂ und 5% CO₂. Um für den Vergleich optimale Bedingungen zu schaffen, wird, ebenso wie im Hypoxie-Versuch, 24h vor der RNA-Extraktion der *Foetal Bovine Serum*-Gehalt auf 0,5% (v/v) reduziert. Dadurch soll sich die Stimulation durch Wachstumsfaktoren reduzieren und der dadurch bedingte Einfluss auf die Versuchsergebnisse reduziert werden (sog. *Starvation*). Die Zellen werden zeitgleich mit den unter Hypoxie inkubierten Zellen der Phenol-/Guanidin-basierten Lyse (Qiazol) zugeführt. Die Lyse erfolgt exakt nach dem Protokoll des Herstellers Qiagen.

2.1.4.3 Hypoxie

Zur Vorbereitung wird ebenso wie unter Normoxie der *Foetal Bovine Serum*-Gehalt im Basismedium 24h vor Hypoxiebeginn auf 0,5 % (v/v) reduziert. Die Hypoxieversuche werden durchgeführt bei 37°C, 5% CO₂, 1% O₂ und diese Bedingungen für 24h

erhalten. Unmittelbar im Anschluss an die Inkubation werden die Zellen wie 2.1.4.2 beschrieben lysiert.

2.1.5 Verwendete Materialien

Produkt	Firma
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Zellkulturmedium 4,5g Glucose / l + L-Glutamin + 25mM HEPES - Pyruvat	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Fetal Bovine Serum, hitzeinaktiviert pH 6,8-8,2, Osmolalität 280-340 mOsmol/kg, Protein 3-4,5g	PAA (Pasching, Österreich)
Penicillin / Streptomycin 100X concentrate 10 000 Einheiten Penicillin 10 mg/ml Streptomycin Gelöst in 0,9% NaCl	PAA (Pasching, Österreich)
DPBS (1X) ohne Calcium und Magnesium Kaliumchlorid (200mg/ml), Kaliumdihydrogenphosphat (200 mg/ml), Natriumchlorid (8000mg/ml), Di-Natriumhydrogenphosphat-Anhydrid (1150mg/ml), Calciumchlorid x 2 H ₂ O (133mg/ml), Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O(133mg/ml)	PAN Biotech (Aidenbach)
Trypsin/EDTA (10x) 0,5%/0,2% in PBS ohne Calcium und Magnesium, steril gefiltert	PAA (Pasching, Österreich)
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen (Hilden)
Smooth muscle cell medium	Promocell (Heidelberg)

2.2 RNA-Extraktion

2.2.1 Phenol-Guanidin-Extraktion mit Säulenaufreinigung

Das miRNeasy Kit (Qiagen) kombiniert eine Phenol/Guanidin-basierte Lyse von Zellmaterial mit einer Siliziumdioxidmembran-basierten Aufreinigung der gesamten

RNA. Guanidin denaturiert Proteine⁸⁴, die in einer wässrigen Phase ausfallen, sich in einer phenolischen Phase allerdings gelöst mit den fettlöslichen Stoffen zusammen anreichern. So entsteht eine wässrige Phase mit Salzen und Nukleinsäuren, jedoch ohne Proteine. Durch Zentrifugation setzt sich die DNA innerhalb der wässrigen Phase unten ab. Der obere Teil der wässrigen Phase enthält dann im Wesentlichen RNA und wird mit Ethanol gemischt, da Ethanol Nukleinsäuren ausfällt, die sich dann im ausgefallenen Zustand im Gegensatz zu den Salzen an eine Silica-Membran binden. Durch die Zugabe von RNase freiem Wasser geht die RNA wieder in Lösung und damit durch die Säulenmembran hindurch. Verwendet wurde das Protokoll des Herstellers.

2.2.2 Phenol-Guanidin-Extraktion mit Fällung

Die Phenol-Guanidin-Extraktion mit Fällung geht zurück auf die Arbeit von Chomczynski et al.⁸⁵. Im Unterschied zu dem Originalprotokoll wird statt Isopropanol Ethanol zur Fällung benutzt, welches die Ausbeute an kleinen RNAs verbessern soll.⁸⁶ Das Prinzip entspricht dem des Qiagen-Protokolls mit Säulenaufreinigung, jedoch wird die gefällte RNA nicht an einer Membran gebunden, sondern durch gekühlte Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wird im Anschluss mit 80%-igem Ethanol (v/v) gewaschen und in RNase-freiem Wasser gelöst werden kann. Diese Extraktion wird nach dem Protokoll von Castoldi et al. durchgeführt.⁸⁶

2.2.3 Kapillarelektrophorese

Der Agilent 2100 Bioanalyzer (Fa. Agilent, Böblingen) ist ein System zur Durchführung einer Kapillarelektrophorese. Diese ist eine Technik zur Auftrennung von Nukleinsäuren durch Anlegen einer Spannung und stellt letztendlich eine modifizierte Gelelektrophorese dar, kommt jedoch mit deutlich geringeren Mengen von Nukleinsäuren aus und spart so Probenmaterial ein.

Ein vorgefertigter Plastikchip mit eingezätztem Kapillarsystem wird mit einer Gel-Farbstoff-Mischung befüllt und dann mit bis zu 12 Proben und einer Referenz-RNA-Probe beladen (sog. *Ladder*).⁸⁷ Dieser Chip wird in den Bioanalyzer geladen und über die dazugehörige Software die Elektrophorese gestartet. Die Auftrennung der Nukleinsäuren kann dann über die Software verfolgt und als Intensitäts-/Zeit-Grafik oder virtuelles Gel ausgewertet werden. Für verschiedene Anwendungen stehen unterschiedliche Chips zur Verfügung.^{87,88}

Die Anwendung der Technik in dieser Arbeit dient in erster Linie der Evaluation der Qualität der extrahierten RNA auf dem RNA-Chip anhand der *RNA-Integrity-Number*(RIN), welche als Qualitätsparameter für Microarrays etabliert ist und sich aus dem Degradationsgrad der RNA-Probe berechnet.^{80,86}

Materialien und Methoden

Des Weiteren wurde zur Bestimmung des micro-RNA-Gehalts in verschiedenen Proben der Chip für kleine RNAs benutzt. Diese Experimente wurden aufgrund der geringen Stückzahl von der Fa. Agilent im Auftrag durchgeführt.

Alle Messungen mit dem Bioanalyser wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.2.4 Spektrophotometrie

Der Nanodrop ND-1000 ist ein Spektrometer, welches die Extinktion (optische Dichte) einer 1µl Probe bei 220-750nm messen kann und das Ergebnis der Messung mit Hilfe der mitgelieferten Software auf den Computer überträgt. Verschiedene Anwendungsmöglichkeiten werden unterstützt. Hier relevant ist vor allem die Messung der Extinktion von Nukleinsäuren bei 260nm, auf deren Basis der Nukleinsäuregehalt bestimmt wird. Weiterhin besteht auch die Möglichkeit Verunreinigungen z.B. durch Proteine (280nm) oder andere Stoffe (230nm) zu detektieren und so die Qualität der Probe einzuschätzen.

In dieser Arbeit wurde der Nanodrop zur quantitativen Bestimmung des Nukleinsäuregehaltes extrahierter RNA-Proben, zur qualitativen Analyse etwaiger Verunreinigungen und zur Kontrolle des Labellings im Rahmen des Agilent-Labelling-Protokolls (Fluoreszenz von Cy5 bei 650nm und Cy3 bei 550nm) benutzt.⁸⁹

2.2.5 Verwendete Materialien

Produkt	Firma
QIAzol Lysis reagent	Qiagen (Hilden)
miRNeasy Kit	Qiagen (Hilden)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
100% Ethanol	Merck (Darmstadt)
75% Ethanol (v/v, verdünnt mit ddH ₂ O von 100%)	Merck (Darmstadt)
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water	Invitrogen (Carlsbad, USA)
RNase-Away-Lösung	Roth (Karlsruhe)
Bioanalyser RNA 6000 Nano Kit	Agilent (Böblingen)

Bioanalyzer Small RNA Kit	Agilent (Böblingen)
RNA-6000 Fragmentlängenstandard	Ambion (Carlsbad, USA)

2.3 Real-Time-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Möglichkeit zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten. Mit Hilfe eines Primers für jeden DNA-Strang bindet daran eine DNA-abhängige DNA-Polymerase und synthetisiert in gepufferter Umgebung aus Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) einen komplementären DNA-Strang. Die Vervielfältigung findet dabei in sog. Zyklen statt: Durch Hitze (ca.95°C) wird die DNA zunächst in ihre Einzelstränge aufgetrennt, dann folgt die Primerhybridisierung (Annealing) bei etwa 60°. Im folgenden Schritt kann dann durch eine DNA-Polymerase beginnend am Primer ein komplementärer Strang synthetisiert werden (Elongation). Die Temperatur der Elongation ist abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase, die gängige Taq-Polymerase des Bakterium *Thermus aquaticus* benötigt etwa 70°C. Die amplifizierte DNA-Sequenz wird mit jedem Zyklus verdoppelt. Durch die Programmierung eines Thermocyclers können nach dem Ansetzen der PCR ein Zyklus Denaturierung, *Annealing* und Elongation beliebig oft nacheinander durchgeführt werden. Der anschließende Nachweis des Amplifikationsproduktes gelingt mit einer Gel-Elektrophorese (siehe 2.5).

Die Real-Time-PCR ist ein Verfahren, welches ermöglicht, mit Hilfe von Fluoreszenz die Vervielfältigung von Nukleinsäuren während der PCR in Echtzeit (*Real-Time*) zu messen. Das Prinzip entspricht einer konventionellen PCR und unterscheidet sich im grundsätzlichen Reaktionsansatz nur in der Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes, welcher in Gegenwart des Amplifikationsproduktes nach Anregung intensiver fluoresziert. Diese Intensitätsveränderung kann mit einem entsprechenden Gerät nach jedem PCR-Zyklus gemessen und digitalisiert werden. Die Messwerte werden schließlich als Amplifikationskurve angezeigt. Der Grenzwert für die Überschreitung einer bestimmten Intensitätsschwelle durch die Amplifikationskurve wird c_t genannt. Um den c_t -Wert eines Amplifikates für verschiedene Proben oder Reaktionsansätze vergleichbar zu machen, kann als dieser Differenz zu einem Referenzgen (Δc_t) bestimmt werden. Referenzgene sollten im Versuch nicht reguliert werden. Im Gegensatz zur konventionellen PCR lassen sich so Aussagen zur Quantität eines Amplifikates treffen.⁹⁰ Außerdem produziert das Real-Time-PCR-Gerät eine Schmelzkurve jedes Amplifikates, anhand welcher

diese (bei bekannter Schmelzkurve) identifiziert werden können. Eine anschließende Gelelektrophorese kann also in der Regel entfallen.

Da die Polymerase der Real-Time-PCR als Matrize DNA erfordert, muss die extrahierte RNA zunächst in DNA umgeschrieben werden. Dies geschieht durch das Verfahren der cDNA-Synthese.

2.3.1 cDNA Synthese

Das Verfahren der cDNA-Synthese beschreibt die Synthese von komplementären DNA aus einer RNA-Matrize mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RTase).

Die RTase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die in Viren der Familie *Retroviridae* entdeckt wurde. Als Substrat benötigt das Enzym einzelsträngige RNA, um daraus bei Vorhandensein eines Primers die Synthese eines komplementären cDNA-Strangs zu katalysieren. Zwingend erforderlich sind weiterhin die vier Desoxyribonucleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP.

Benutzt wurde in dieser Arbeit die RTase des Gammaretrovirus *Moloney Murines Leukämievirus* (MuLV); als Primer dienen zufällige Sequenzen von sechs Nukleotiden, sog. *random hexamers*, um die gesamte mRNA in cDNA umschreiben zu können. Die Reaktion läuft unter gepufferter Umgebung und Zusatz von Magnesiumchlorid und eines RNase-Inhibitors ab. Vor der eigentlichen reversen Transkription erfolgt zunächst eine Denaturierung, um eine Bindung der reversen Transkriptase an den Einzelstrang zu vereinfachen.

2.3.1.1 Denaturierung

Material:

0,5-1µg RNA in 10 µl H₂O

Durchführung:

1. 10 min bei 70°C (Thermoblock)
2. 5 min Ruhen auf Eis
3. Kurze Anzentrifugation
4. cDNA-Synthese (2.3.1.2)

2.3.1.2 Protokoll cDNA Synthese

Reagenz	Zusammensetzung - Konzentration	Volumen
10 X PCR Buffer II	100mM Tris-HCl, 500mM KCl, pH=8,3 - 2X im Ansatz	2µl

Materialien und Methoden

MgCl ₂	25mM - 10mM im Ansatz	4µl
dNTPs	je 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP – je 1mM im Ansatz	1µl
Random Hexamers	50µM – 5µM im Ansatz	1µl
RNase Inhibitor	20U/µl - 1U/µl im Ansatz	0,5µl
Reverse Transkriptase	50U/µl – 5U/µl	1µl
ddH ₂ O		0,5µl
		<hr/>
		10µl

Material:

Lösung aus 10µl RNA-Lösung aus 2.4.1.1 und 10µl Reaktionsansatz

Durchführung:

1. 10 min bei 20°C *Annealing*
2. 240 min bei 43°C reverse Transkription / Elongation
3. 5 min bei 99°C zur Denaturierung der RT, Stop der Reaktion
4. Kühlung bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung oder direkte Lagerung bei - 20°C

2.3.2 Durchführung

Die Durchführung der Real-Time-PCR erfolgt mit der in 2.4.1 hergestellten cDNA als Substrat. Zusätzlich zu den Grundkomponenten einer PCR enthält der Ansatz ROX-Farbstoff als Referenzfarbstoff, um Variationen der Fluoreszenz zwischen den Reaktionsansätzen z.B. durch Pipettierfehler auszugleichen. Außerdem enthält jeder Ansatz Uracil-DNA Glykosylase, welche, bei Verwendung von dUTP statt dTTP für die PCR, Kontaminationen vorheriger PCRs durch Hydrolyse uracilhaltiger DNA verhindert. Ein Reaktionsansatz zu 25µl wird entsprechend der folgenden Tabelle hergestellt:

Reagenz	Zusammensetzung - Konzentration	Volumen
Invitrogen Supermix	2X SuperMix-Buffer: 3M MgCl ₂ , dNTPs, Uracil-DNA-Glycosylase (UDG), SYBR-Green I, 0.5 µl ROX- Dye	13µl
MgCl ₂	50mM – 2mM im Ansatz	1µl
SYBR® Green I	1:1000	1µl
Forward Primer	10µM – 0,2µM im Ansatz	0,5µl

Materialien und Methoden

Reverse Primer	10 μ M – 0,2 μ M im Ansatz	0,5 μ l
cDNA Template		2 μ l
ddH ₂ O		7 μ l
		25 μ l

Die einzelnen Reaktionsansätze werden in eine 96-Well PCR-Platte pipettiert und mit einer Folie versiegelt. Die Real-Time-PCR wird entsprechend dem folgenden Programm mit Schmelzkurvenanalyse durchgeführt:

Stufe 1: 50°C - 2min *UDG-Reaktion*

Stufe 2: 95°C - 5min *UDG-Denaturierung*

Stufe 3 (40 Zyklen):

95°C – 5s *Denaturierung*

60°C – 5s *Annealing*

72°C – 10s *Extension*

2.3.3 Verwendete Materialien

Produkt	Firma
SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Roche, 11988131001)	Roche (Penzberg)
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG <i>mit MgCl₂ 50mM, ROX und 20X bovine serum albumine extra</i>	Invitrogen (Carlsbad, USA)
RNAse-Away rePlatinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG <i>mit MgCl₂ 50mM, ROX und 20X bovine serum albumine extra</i>	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Random Hexamers (50 mM)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
GeneAmp® dNTP' s with dUTP	Invitrogen (Carlsbad, USA)

Primer huPBGD, 70bp FP-5'-CCC ACG CGA ATC ACT CTC AT-3' RP-5'-TGT CTG GTA ACG GCA ATG CG-3' huPGK1, 111bp FP 5'- GAC GTT AAA GGG AAG CGG GT -3' RP 5'- GAA TTT GAT GCT TGG GAC AGC -3' huHPRT, 91bp FP 5'-AGG AAA GCA AAG TCT GCA TTG TT-3' RP 5'-GGT GGA GAT GAT CTC TCA ACT TTA A-3'	MWG Biotech (Ebersberg)
Rnase Inhibitor 20U/µl	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
MuLV Reverse Transcriptase 5000U	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
GeneAmp® 10 X PCR Buffer II 100mM Tris-HCl, 500mM KCl, pH=8,3	Invitrogen (Carlsbad, USA)
GeneAmp® MgCl ₂ 25mM Set mit PCR Buffer II	Invitrogen (Carlsbad, USA)
MicroAmp® 96-Well PCR Plate	Invitrogen (Carlsbad, USA)
MicroAmp® Clear Adhesive Film	Invitrogen (Carlsbad, USA)

2.4 Real-Time PCR mit microRNAs

Diese besondere Form der Real-Time-PCR wurde durchgeführt um die mit Hilfe des Microarrays detektierten Regulierungen von microRNAs unter Hypoxie zu validieren. Um der verhältnismäßig kurzen Sequenz der micro RNAs gerecht zu werden, muss hier ein microRNA spezifisches reverse Transkription- und Real-Time-PCR System verwendet werden. Hier vorgestellt und benutzt wird das miScript PCR System der Firma Qiagen. Dieses gliedert sich in zwei Schritte:

Im ersten Schritt wird die reverse Transkription durchgeführt. Hierzu werden zunächst unspezifisch alle microRNAs am 3'-Ende polyadenyliert, damit dort ein Oligo-dT Primer binden kann. Mit Hilfe der reversen Transkriptase kann dann von 3'- nach 5'

eine zur microRNA komplementäre cDNA synthetisiert werden. Die dazu erforderlichen Substrate sind im Reaktionsansatz enthalten.

Im zweiten Schritt wird die Real-Time-PCR durchgeführt, der *forward primer* hat hierbei die zur cDNA komplementären, micro-RNA-spezifischen DNA-Sequenz. Der *reverse primer* ist universell und komplementär zum Oligo-dT-Primer.

An Stelle der von Qiagen vorgesehenen miRNA-spezifischen Primer wurde die entsprechende miRNA-Sequenz in DNA als Primer verwendet. Der Rest der Durchführung entspricht dem Handbuch der Firma Qiagen.

2.4.1 Verwendete Materialien

Produkt	Firma
miScript SYBR Green PCR Kit (200) enthält 2x QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix (mit ROX dye), miScript Universal Primer	Qiagen (Hilden)
miScript RT Kit enthält Oligo-dT Primer, RT-Puffer, Reverse Transkriptase Mix (RT und Poly(A)-Polymerase), Nucleics Mix (dNTPs, rATP, Oligo-dT- Primer)	Qiagen (Hilden)
miScript PCR Control Set	Qiagen (Hilden)
Primer hsa-miR-210: 5'-CTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA-3' hsa-miR-183: 5'-TATGGCACTGGTAGAATTCACT-3' hsa-miR-296-5p: 5'-AGGGCCCCCCTCAATCCTGT-3' hsa-miR-744: 5'-TGCGGGGCTAGGGCTAACAGCA-3' hsa-miR-510: 5'-TACTCAGGAGAGTGGCAATCAC-3' hsa-miR-525-5p: 5'-CTCCAGAGGGATGCACTTTCT-3'	MWG Biotech (Ebersberg)

2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Überprüfung der Länge der Amplifikationsprodukte der Real-Time-PCR. Dies ist erforderlich, um die PCR-Produkte zu identifizieren und damit auszuschließen, ein falsches Genprodukt amplifiziert zu haben und so nicht die gewünschten c_t -Werte gemessen zu haben. Bei bekannter Schmelzkurve ist jedoch eine Gelelektrophorese im Anschluss an die Real-Time-PCR nicht zwingend

notwendig, da das Produkt anhand des Schmelzpunktes identifiziert werden kann (siehe Abschnitt 2.4).

Durch das Anlegen einer Spannung wandert das mit einem Ladepuffer vermischte Amplifikationsprodukt bedingt durch die negative Ladung der DNA in wässrigen Lösungen in Richtung der Anode. Die Geschwindigkeit der Wanderung durch das Gel ist dabei allgemein abhängig von der Länge des DNA-Fragmentes (Agarose-Konzentration, Spannung und Puffer beeinflussen ebenfalls die Geschwindigkeit, sind aber für alle Amplifikate konstant), d.h. längere Basensequenzen haben eine langsamere Wanderungsgeschwindigkeit als kurze. Da die Spannung für eine konstante Zeit (50min) angelegt wird, kann man also von der zurückgelegten Strecke auf die Länge schließen und einem Amplifikat zuordnen. Sichtbar gemacht wird die DNA-Bande durch die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid, welcher unter Anregung durch UV-Licht in Anwesenheit von Nukleinsäuren heller fluoresziert als in deren Abwesenheit. Die DNA erscheint dann als helle Bande, die mit einer Referenz bekannter Länge verglichen werden kann. Als Referenz dient in dieser Arbeit durch das Restriktionsenzym Hinf I des Bakteriums *Hämophilus influenzae* fragmentierte DNA des Bakteriophagen ϕ X174.

2.5.1 Durchführung

1. Gelherstellung:

- 2% Agarose → 1g Agarose auf 50ml 1x TBE-Puffer
- 1 min 30s in die Mikrowelle, zwischendurch mehrfach umschwenken
- 1,5 μ l Ethidiumbromid in die Gel-Lösung, gut mischen
- Kamm für Geltaschen einsetzen, Gel in die Kammer gießen
- Nach dem Aushärten Gel vollständig mit 1X TBE-Puffer bedecken, Kamm entfernen

2. Gelbeladung:

- 3,5 μ l Ladepuffer zu jeder PCR-Probe
- gut mischen
- 10 μ l Probe-Ladepuffer-Gemisch pro Gel-Tasche
- 3 μ l Marker Hinf I in die dafür vorgesehenen Taschen

2.5.2 Verwendete Materialien

Produkt	Firma
TBE-Puffer (1x) 89mM Tris, 89mM Borsäure, 2mM EDTA, pH 8.	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Φ X174 HInf I Fragmentlängenstandard	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Ethidiumbromid-Lösung 10mg/ml (g/v) in H ₂ O	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Agarose	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ladepuffer Bromophenol blau (0.05% w/v), Saccharose (40% w/v), EDTA (0.1M, pH 8.0), SDS (0.5% w/v).	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.6 Fluoreszenz-Markierung (Labelling)

2.6.1 Allgemeines

Das *Labelling* ist ein für die Detektion einer Probe auf Microarrays zwingend erforderlicher Schritt, in welchem RNA-Moleküle inklusive der kleinen RNAs enzymatisch mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt werden. Diese Fluoreszenz kann dann im folgenden Schritt (siehe Abschnitt Microarrays) vom Microarray-Scanner detektiert werden. Eine Spezifität des Labellings für die zu untersuchenden RNAs ist dabei nicht erforderlich, diese wird durch das jeweils verwendete Microarrays gewährleistet. In dieser Arbeit wurden im Rahmen der Etablierung von microRNA-Microarrays zwei verschiedene Labellingmethoden verwendet und verglichen. Das mRNA-Labelling für die Agilent 4x44k Microarrays wird aufgrund der methodisch geringen Relevanz für die Thematik im Abschnitt Microarrays kurz beschrieben.

2.6.2 Exiqon miRCURY LNATM microRNA Array Power Labelling Kit

Das miRCURY LNATM microRNA Array Power Labelling Kit beruht auf einer enzymatischen Methode, die in zwei Schritten abläuft:

Im ersten Schritt werden mit Hilfe der *Calf Intestine Phosphatase* (CIP), einer unspezifischen alkalischen Phosphatase aus dem bovinen Darm, 5'-Phosphate von RNAs ab-

gespalten. Diese Reaktion ist zwar für die Kopplung der Farbstoffe nicht notwendig, verhilft aber zu verringerten Verlusten an microRNAs durch Selbstzirkularisation und unspezifische Basenpaarungen während der Labelling-Reaktion. So soll laut Hersteller so ein gleichmäßigeres und repräsentativeres micro-RNA-Labelling gewährleistet, und somit auch unmittelbar die Sensitivität des Arrays erhöht werden.

Im zweiten Schritt folgt das enzymatische Anfügen des Farbstoffes (*Hy3* oder *Hy5*) an das 3'-Ende der micro-RNAs. Im Anschluss an diesen Schritt kann die Hybridisierung beginnen.

Die Durchführung folgt exakt den Vorgaben des durch den Hersteller mitgelieferten Protokolls.

2.6.3 T4-Ligase vermitteltes Labelling

Die T4 RNA Ligase ist ein Enzym, welches ATP-abhängig ein 5'-Phosphat-Ende einer Nukleinsäure mit dem 3'-OH-Ende einer anderen Nukleinsäure verknüpfen kann. In diesem Fall wird also der entsprechende RNA-linker mit einem Cy-Farbstoff am 3'-Ende und Phosphat am 5'-Ende mit dem 3'-Ende einer micro-RNA verknüpft. Die Reaktion erfolgt bei etwa 4°C, um durch geringere Molekülbewegungen und weniger unspezifische Basenpaarungen das Labelling zu verbessern. Das Protokoll folgt im Wesentlichen dem der Publikation von Castoldi et al.⁸⁶, wird jedoch aufgrund seiner fundamentalen Bedeutung für diese Arbeit im Folgenden ausführlich beschrieben. Eine dem Exiqon-Labelling-Protokoll entsprechende Dephosphorylierungsreaktion kann der Ligation vorangeschaltet werden, wird jedoch von den Autoren nur bei geringer RNA-Ausbeute empfohlen und wurde in dieser Arbeit nicht verwendet.

Tag 1

1. 2 µg Gesamt-RNA werden in 10 µl RNase-freiem Wasser aufgelöst.
2. Master Mix Herstellung (n-fach, pro verwendeten Farbstoff ein Mastermix):

Reagenz	Zusammensetzung / Konzentration	Volumen
T4 Ligase Puffer	10x	3,2µl
ddH ₂ O	RNase frei	3,1µl
PEG 6000	50% (w/v)	10µl
Adenosintri-phosphat	200mM in ddH ₂ O	0,2µl
Cy-Farbstoff-RNA-Linker	100µM	2µl

Materialien und Methoden

RNAse Inhibitor	40U/l	0,5µl
T4 RNA Ligase	5U/l	3µl
		22µl

3. In jedes Reaktionsgefäß mit 2µgRNA mit ddH₂Oµl werden 20µl des Master-Mixes hinein pipettiert.
4. Der Ansatz wird kurz und vorsichtig im Vortexer durchmischt, 15s an zentrifugiert und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Tag 2

1. Die Labellingreaktion wird durch 5minütiges Inkubieren bei 95°C im Thermoblock gestoppt (Inaktivierung der T4-Ligase durch thermische Denaturierung).
2. 70µl des nach der folgenden Tabelle angesetzten Präzipitationsmixes werden dem Reaktionsgefäß hinzugefügt:

Reagenz	Zusammensetzung / Konzentration	Volumen
ddH ₂ O	RNAse frei	62,5µl
Natriumacetat	3Mol/l, pH=5,5	10,3µl
Lineares Acrylamid	5µg/µl	0,5µl
		73,3µl

3. 300µl 100% Ethanol werden dem Reaktionsgefäß hinzugefügt, kurz mit dem Vortexer durchmischt und für mindestens 60min bei -80°C inkubiert (Fällung der RNA).
4. Zentrifugation für 30min bei 4°C und 20000U/min (Pellettierung der ausgefällten RNA)
5. Der Überstand wird abgeschüttet und frisch angesetztes 80%iges Ethanol hinzugefügt. Durch das frische Ansetzen wird verhindert, dass der Ethanolgehalt durch Verdunstung falsch zu niedrig ist und eventuell Teile des Pellets in Lösung gehen könnten. Dieser Waschvorgang wird in Teilen der Arbeit mehrfach durchgeführt, darauf wird ggf. gesondert hingewiesen.
6. Das Ethanol wird abgekippt und die Proben bei 37°C luftgetrocknet. Alternativ kann auch eine Vakuumzentrifuge verwendet werden.
7. Das Pellet wird in 150µl RNAse-freiem Wasser aufgelöst. Damit ist die Probe bereit zur Hybridisierung. An diesem Punkt kann sowohl die gelöste RNA, als auch das Pellet ggf. bei -80°C eingefroren werden.

2.6.4 Verwendete Materialien

Produkt	Firma
miRCURY LNA™ microRNA Array Power Labeling Kit: Calf Intestine Phosphatase (CIP) CIP Puffer Hy5™ Fluorescent Label Hy3™ Fluorescent Label Labelling Enzym Labelling Puffer DMSO Nuklease-freies Wasser	Exiqon (Vedbaek, Dänemark)
T4-RNA-Ligase 5U/l	Ambion (Carlsbad, USA)
T4-RNA-Ligase Puffer	Ambion (Carlsbad, USA)
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
RNase-Inhibitor 40U/l	Ambion (Carlsbad, USA)
Polyethylenglykol (PEG) 6000 50%(w/v)	Fluka (St. Louis, USA)
RNA-Linker Cy3: (5'-)p-rUrUrUrU-Cy3(-3')	Biospring (Frankfurt a.M.)
RNA-Linker Cy5(5'-)p-rUrUrUrU-Cy5(-3')	Biospring (Frankfurt a.M.)
Lineares Acrylamid	Ambion (Carlsbad, USA)
Natriumacetat pH 5,5	Ambion (Carlsbad, USA)
Nuklease-freies Wasser	Invitrogen (Carlsbad, USA)

2.7 Microarrays

2.7.1 Micro-RNA Microarrays

2.7.1.1 Allgemeines

Das Konzept der Micro-RNA Microarrays bietet die Möglichkeit, eine schnelle und zugleich umfassende Analyse des Micro-RNA Expressionsprofils von Zellen oder auch Gewebe durchzuführen. Im Gegensatz zu mRNA-Microarrays existieren hierbei einige besondere Schwierigkeiten⁹¹:

Die Kürze der Nukleotidsequenz von miRNAs erschwert sowohl das Markieren als auch die Herstellung einer spezifisch und stabil daran bindenden Sonde. Des Weiteren repräsentieren die micro-RNAs lediglich ~0,01% der Gesamt-RNA-Masse⁹¹ und existieren dabei in drei Formen: der aktiven Form und ihren beiden Vorläufern, der pre-miRNA mit Haarnadelstruktur und der pri-miRNA⁹². Gemessen werden soll allerdings nur das Signal der aktiven miRNA.

Daher sollte ein miRNA-Microarray an diese Anforderungen angepasst sein und außerdem zur Verbesserung der Sensitivität zwischen miRNAs differenzieren können, die sich lediglich in einem Nukleotid unterscheiden.⁹³

2.7.1.2 Locked Nucleic Acids (LNA™)

LNAs beinhalten eine Klasse von modifizierten Nukleotiden, in denen eine Sauerstoff-Methylenbrücke das C2- und das C4- Atom des Furanose-Rings verbindet, womit dieser in der C3-endo Konformation chemisch fixiert ist. Diese Fixierung verursacht eine erhöhte Thermostabilität, womit die Schmelztemperatur eines RNA:LNA Duplexes pro eingefügtem LNA-Monomer um 2-10°C steigt. In verschiedenen Studien konnte dabei durch chemische Strukturanalysen gezeigt werden, dass für LNA in Bezug auf die Basenpaarung im Vergleich zur RNA kein Unterschied besteht.⁹⁵⁻⁹⁸

Da die berechneten T_m -Werte für die bekannten miRNAs in Bezug auf einen komplementären DNA-Strang zwischen 45°C und 75°C variieren, kann eine gleichwertige Hybridisierung von miRNAs mit hoher T_m und niedriger T_m bei einer standardisierten Hybridisierungstemperatur nicht gewährleistet werden.⁹³ Durch das selektive Einfügen von LNAs in die Fängermoleküle sollen die individuellen T_m der Hybridisierungstemperatur angenähert werden und damit deren Einfluss auf die Hybridisierung minimiert werden. Dieses Verfahren nennt sich Schmelzpunktnormalisierung.

2.7.1.3 MiChip Microarray Plattform

Diese 2006 publizierte Methode⁹³ verwendet die oben beschriebene LNA-Technologie und benutzt ein LNA™-Sondenset der Firma Exiqon, welches dann maschinell auf einen mit N-Hydroxysuccimid(NHS) beschichteten Glasobjektträger der Firma CodeLink synthetisiert wird. In dieser Arbeit wurden die fertigen Microarrays freundlicherweise von der *Genomics Core Facility* des *European Molecular Biology Lab* (Dr. V. Benes, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Benutzt wurden die MiChip Version 9.2 und Version 11.0, entsprechend der miRBase 9.2 und 11.0 für *Homo sapiens* und *Mus musculus*.

Der miChip V9.2. enthält 415 unterschiedliche miRNA Sonden für *mus musculus* und 569 für *homo sapiens*, die V11.0 849 für *homo sapiens* und 415 für *mus musculus*. Zusätzlich sind Sonden für Ratte, Viren und andere kurze RNAs auf dem Array vorhanden (entsprechend dem Exiqon Probenstet s.u.), diese werden in dieser Arbeit jedoch nicht benutzt. Alle Proben sind jeweils doppelt vorhanden.

Der Versuchsablauf schließt sich unmittelbar an das Labelling an, die Waschpuffer werden selbst angesetzt. Zur Hybridisierung wird die Agilent SureHyb Hybridisierungskammer verwendet. Der Ablauf entspricht dem Protokoll von Castoldi et al.⁸⁶

1. Das farbmarkierte RNA-Pellet wird in 150µl RNase-freiem Wasser aufgelöst, 300µl vorgewärmten Hybridisierungspuffers hinzugefügt und das Reaktionsgefäß leicht im Vortexer geschüttelt.
2. Die Proben werden für 7min bei 95°C denaturiert und danach für 5min bei Raumtemperatur zentrifugiert.
3. Die Proben werden in die Hybridisierungskammer geladen und über Nacht bei 54°C hybridisiert.
4. Am Ende der Hybridisierung werden die Objektträger einzeln aus den Hybridisierungskammern entfernt und in Waschpuffer 1 bei Raumtemperatur von dem *Gasket slide* gelöst. Um den Hintergrund zu reduzieren, sollte der Objektträger zunächst stark in WP1 geschüttelt werden. Danach werden die Objektträger bis zur weiteren Waschung in WP 1 aufbewahrt.
5. Weiteres Waschprotokoll:
 - 1: 10 min bei Raumtemperatur in WP 1 (0,2 X SSC; 0,1% SDS)
 - 2: 10 min bei Raumtemperatur in WP 2 (0,2 X SSC)
 - 3: 10 min bei Raumtemperatur in WP 3 (0,1 X SSC)
 - 4: 05 min bei Raumtemperatur in WP 3 (0,1 X SSC)
 - 5: kurz in ddH2O stark schütteln und durch Zentrifugation bei 1500 rpm für 2min trocknen
6. Scannen

2.7.1.4 miRCURY LNA™ microRNA Array Kit

Dieses Kit enthält in der verwendeten Version neben den Microarray Slides, entsprechend miRBase V10.0, bereits den Hybridisierungs- und Waschpuffer, sowie das Spike-In miRNA Kit mit 10 synthetischen Positivkontrollen.

Das Microarray besteht aus 1154 LNA™-Sonden für Mensch, Maus, Ratte und Viren und zusätzlich einigen miRPlus™-Sequenzen für bisher nicht gelistete miRNAs. Außerdem enthalten sind 10 Spike-In Positivkontrollen, 7 Negativkontrollen und 12 Sonden für snRNAs. Der Objektträger hat die Außenmaße mit 25,4 x 76,2mm und passt damit in die Agilent SureHyb Hybridisierungskammer. Das Array an sich hat das Format 17 x 36mm und besteht aus 8 Unterarrays in 4 Replikaten. Jedes dieser 36 Unterarrays besitzt an allen vier Ecken sog. *landing lights*, die bei der Ausrichtung des Rahmens für die Bildanalyse helfen sollen.

Die Durchführung der Hybridisierung auf dem Microarray erfolgt exakt nach den im Handbuch geschilderten Vorgaben des Herstellers.

2.7.1.5 miRXplore™ Microarray Kit:

Auf diesem Microarray sind konventionelle DNA-Sonden aufgebracht. Trotz des im Handbuch angegebenen Formats von 25 x 75mm passten die Objektträger in der Breite nicht in die Agilent SureHyb Hybridisierungskammer, daher wurde eine Kammer der Firma MWG verwendet. Es gibt 728 Sonden für *homo sapiens* und 584 für *mus musculus*, zusätzlich ebenfalls noch weitere Sonden für Viren und Ratte. Zusätzlich existieren 3 mitgelieferte Positivkontrollen (miRControl 1-3) und 13 Negativkontrollen.

Die Durchführung der Hybridisierung auf dem Microarray erfolgt exakt nach den im Handbuch geschilderten Vorgaben des Herstellers.

2.7.2 mRNA Microarrays

Zur Hybridisierung und Analyse von mRNAs wurden Agilent *4x44k Whole Genome* Microarrays zusammen mit dem *QuickAmp* Labelling des selben Herstellers benutzt. Hierfür wird aus der extrahierten RNA zunächst cDNA synthetisiert und diese dann mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase amplifiziert und mit dem Cy-Farbstoff markiert. Das entstehende Produkt ist eine cRNA (*complementary RNA*), welche dann direkt auf einem Microarray hybridisiert werden kann. Die Durchführung erfolgt exakt nach dem im Handbuch geschilderten Vorgaben des Herstellers für zweifarbige Microarrays.

2.7.3 Verwendete Materialien

Produkt	Firma
miRCURY LNA™ microRNA Array Power Labeling Kit: Calf Intestine Phosphatase (CIP) CIP buffer Hy5™ Fluorescent Label Hy3™ Fluorescent Label Labeling Enzyme Labeling buffer DMSO Nuclease-free water	Exiqon (Vedbaek, Dänemark)
miRCURY LNA™ microRNA Array Kit: miRCURY LNA™ microRNA Microarrays Hybridization Buffer Detergent Solution (10%) Salt Buffer (20x) Spike-in miRNA Kit: 10 synthetische, ungelabelte miRNAs	Exiqon (Vedbaek, Dänemark)
miChip V.9.2 und 11.0	EMBL (Heidelberg)
miRXplore™ Microarray Kit: miRXplore™ microRNA Microarrays Prehybridization Solution (1x) Wash Buffer 1 und 2 (25x) Hybridization Solution (2) miRControl 1-3 CD-Rom	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Whole Human Genome Microarray Kit 4x44k: Fünf Slides mit je vier 44k Arrays	Agilent Technologies (Böblingen)
Hybridization Chamber Kit - SureHyb enabled, Stainless	Agilent Technologies (Böblingen)
Hybridization Gasket Slide Kit (100) - 1 microarray per slide format	Agilent Technologies (Böblingen)

Materialien und Methoden

Hybridization Gasket Slide Kit (100) - 4 microarrays per slide format	Agilent Technologies (Böblingen)
Acetonitril	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Stabilization and Drying Solution	Agilent Technologies (Böblingen)
Agilent Wash Buffer	Agilent Technologies (Böblingen)
Quick Amp Labeling Kit, two Color MMLV-RT, 25 µL (2 vials) T7 Promotor Primer, 30 µL RNaseOUT, 25 µL 5x First Strand Reaction buffer, 195 µL 4x Transcription buffer, 430 µL 10 mM dNTP mix, 25 µL NTP mix, 175 µL 0.1M DTT, 230 µL T7 RNA Polymerase, 20 µL 50% PEG (Polyethylene glycol), 140 µL Cyanine 3-CTP and Cyanine 5-CTP	Agilent Technologies (Böblingen)
20X Salt Sodium Citrate (SSC) Na ₃ Citrat-Dihydrat 88,3g NaCl 175,3g Adjustieren auf pH=7 mit HCl-Lösung	Komponenten von Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
10% Sodium Dodecyl Sulfat (SDS, vol/vol)	Serva (Heidelberg)
miChip WP1: 0,2X SSC (verd. von 20X SSC), 0,1% SDS (vol/vol, verd von 10% SDS)	
miChip WP2: 0,2X SSC (verd. von 20X SSC)	
miChip WP3: 0,1X SSC (verd. von 20X SSC)	

miChip Hybridisierungspuffer 1,5X 7,5X SSC (verd. von 20X SSC) 0,15 % SDS (vol/vol) (verd. von 10% SDS (vol/vol)) 37,5% Formamid 150mg/ml hering sperm DNA RNase-freies Wasser	Clontech (St.Germain-en-Laye, Frankreich) Promega (Mannheim) Invitrogen (Carlsbad, USA)
---	--

2.8 Datenverarbeitung und –auswertung

Das Scannen der Microarrays und die Bildanalyse wird mit der GenePix Software Version 6.0 durchgeführt.

Für andere Anwendungen benötigte Software wird im Folgenden aufgelistet. Diese entsprechen dem Lieferumfang der jeweiligen Geräte. Die weitere Verarbeitung, Visualisierung und Auswertung sämtlicher Daten erfolgt mit R und Microsoft Excel.

2.8.1 MiRNA- und mRNA-Array Auswertung im Speziellen

Die Auswertung eines Microarrays stellt bedingt durch die große Datenmenge mit teilweise redundanten Informationen und die erforderliche Weiterverarbeitung der Rohdaten eine besondere Herausforderung dar. Um Fehler zu minimieren, bietet sich eine standardisierte Prozedur an. Zur Auswertung benutzt wurde in dieser Arbeit das Programm R, weil hier die Möglichkeit besteht, die Auswertung in ein Skript zu programmieren und dann standardisiert die Rohdaten mit Hilfe dieses Skriptes zu verarbeiten. Außerdem existieren für R bereits umfangreiche Skripte und speziell Erweiterungen (sog. *packages*), die öffentlich sind und mitbenutzt werden können.

Zum besseren Verständnis der Microarray-Auswertung werden dafür wichtige Begriffe im Folgenden genauer erklärt:

- Log Fold change: Der log Fold Change (logFC) ist ein Verfahren zur Berechnung von Genregulation in Microarrays. Die log₂-Transformation dient dazu, die Intensitätsverteilungen zu verdichten, um Grafiken und Analyse zu vereinfachen. So wird aus einer ursprünglichen Intensitätsverteilung von 0-65000 eine Verteilung von 0-16. Ein Fold Change (FC) gibt den Faktor der Intensitätsänderung eines Gens an, der logFC bezieht sich dementsprechend auf die Intensitätsänderung nach log₂-Transformation (logFC=1 entspricht einer Verdopplung der Intensität). Die Verwendung eines logFC bietet sich bei Microarrays an, da nicht die absoluten Intensitätswerte oder – veränderungen im Fokus

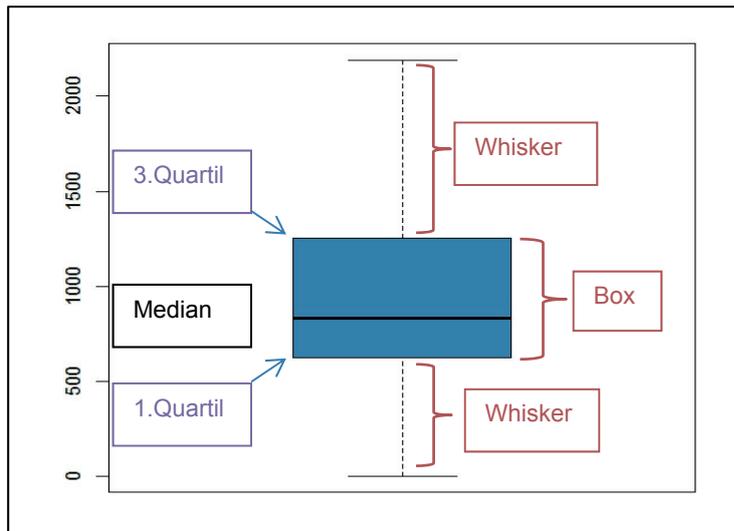


Abbildung 2.1 Beispiel für einen Boxplot

Die Box markiert den Median, das erste und das dritte Quartil. Die Whisker entsprechen Minimum und Maximum der Werte, falls diese den 1,5-fachen Interquartilsabstand vom Median nicht überschreiten.

- des Interesses stehen, sondern die relative Änderung der Expression eines Gens z.B. nach Stimulation.
- Boxplot: Ein Boxplot ist eine grafische Darstellung der Verteilung einer Variablen (Abbildung 2.1). Er besteht zunächst aus einer Box, welche das obere und untere Quartil anzeigt. Innerhalb dieser Box ist als zusätzliche Information der Median als dicker Strich markiert. Des Weiteren sind außerhalb der Box sog. *Whisker* eingezeichnet, welche das Minimum und das Maximum der Werte anzeigen. Sind jedoch Minimum und Maximum mehr als den 1,5-fachen Interquartilsabstand vom Median entfernt, werden darüber oder darunter liegende Ausreißer als Punkte dargestellt und die Whisker markieren den 1,5-fachen Interquartilsabstand.
 - MA-Plot: Ein MA-Plot ist eine um 45° rotierte Darstellung des Plots zweier Intensitätswerte (z.B. Rot gegen Grün, aber auch grün gegen grün bei einfarbigen Mikroarrays). Auf der y-Achse ist der M-Wert ($M = \log_2(\text{Intensität } 1) - \log_2(\text{Intensität } 2)$) dargestellt, auf der x-Achse der A-Wert (mittlere Intensität, $A = \frac{1}{2} * [\log_2(\text{Intensität } 1) + \log_2(\text{Intensität } 2)]$)⁹⁹
 - Volcano-Plot: Ein Volcano Plot ist eine Darstellung zur Regulation von Genen in Microarrays.¹⁰⁰ Dargestellt sind auf der y-Achse der negative, zur Basis 10 logarithmierte p-Wert ($-\log_{10}(p)$) und auf der x-Achse der logFC.
 - Heatmap / *hierarchical clustering*: Eine Heatmap ist eine Methode, die Regulation vieler untersuchter Werte/Gene in mehreren Gruppen gleichzeitig darzustellen. Hierbei wird ein Wert für Expression oder Regulation farbcodiert und mit den anderen untersuchten Werten in einer Karte dargestellt. Diese Darstellungsmethode wird meistens mit einem

hierarchical clustering kombiniert, d.h. die sich am ähnlichsten verhaltenden Proben werden in der Karte jeweils nebeneinander dargestellt.

- T-Test: Der T-Test ist ein statistischer Test, der für eine oder zwei Stichproben analysiert ob diese sich vom Sollwert unterscheiden (eine Stichprobe) bzw. diese aus Populationen mit demselben Erwartungswert stammen (zwei Stichproben). Es gilt die Annahme der Nullhypothese H_0 : Die Mittelwerte der Grundgesamtheit unterscheiden sich nicht.
- Moderierter T-Test: Der moderierte T-Test basiert auf der Annahme, dass durch die unabhängige Betrachtung einzelner Gene Informationen großer Datensätze nicht genutzt werden können.¹⁰¹ Das Prinzip beruht auf einer gemeinsamen Betrachtung der Varianzen einzelner Gene und der Varianzen von Gengruppen und der Berechnung einer gewichteten mittleren Varianz nach dem empirischen Bayes-Verfahren aus diesen beiden Werten.
- Anova: Dieser Begriff steht für die englische Bezeichnung *analysis of variance* und stellt vom Prinzip her einen erweiterten T-Test für mehr als zwei Gruppen dar.
- Multiples Testen: Bei zunehmender Anzahl an Signifikanztests steigt die Anzahl der falsch Positiven (Fehler 1.Art) an. So sind z.B. bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ bei 20 untersuchten Genen mit einem, bei 100 Genen schon mit fünf falsch Positiven zu rechnen. Da besonders in Microarrays viele Gene gleichzeitig untersucht werden, muss man den errechneten p-Wert (für engl. *probability* = Wahrscheinlichkeit als Wert des Signifikanzniveaus α bei dessen Vorliegen H_0 abgelehnt wird) für multiples Testen korri-

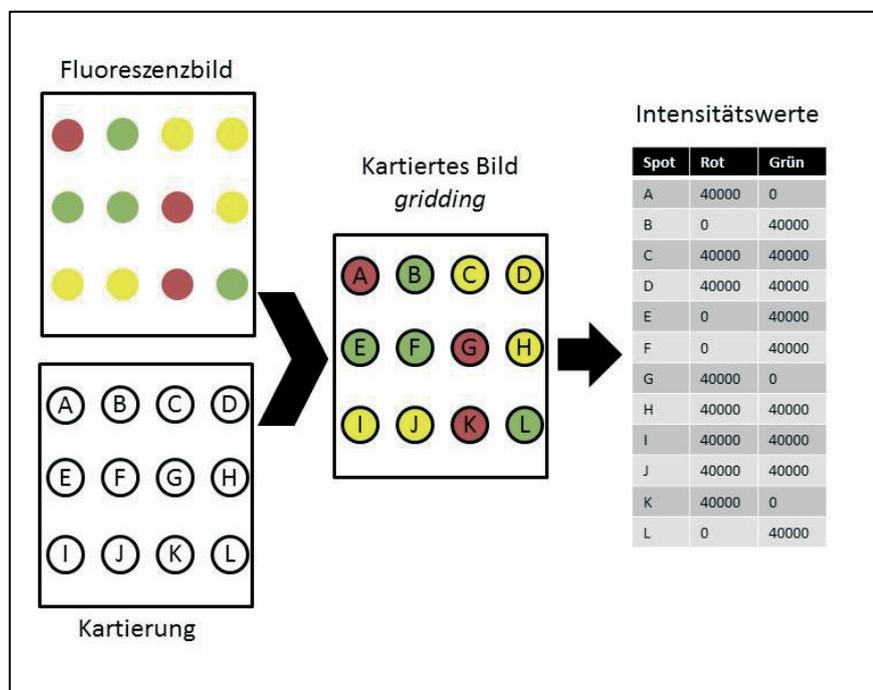


Abbildung 2.2 Schema der Bildanalyse eines Microarrays

Die Paarung von vorhandener Kartierung und ermitteltem Fluoreszenzbild ergibt ein kartiertes Fluoreszenzbild, aus welchem die Intensitätswerte abgelesen werden können.

Materialien und Methoden

gieren, um die Anzahl der falsch Positiven zu kontrollieren. Hierfür existieren verschiedene Methoden, in dieser Arbeit kommen jedoch lediglich die für Microarrays am häufigsten verwendete Methode zur Kontrolle der sog. *false discovery rate* (fdr) nach Benjamini und Hochberg zur Anwendung. Hierbei wird der errechnete p-Wert so korrigiert, dass bei Ablehnung von H_0 gerade $\alpha \cdot 100\%$ falsch positive Ergebnisse unter den abgelehnten Nullhypothesen H_0 erwartet sind.^{102,103} Üblicherweise wird eine fdr von 20% bei Microarray-Experimenten akzeptiert.

Eine miRNA-Array-Datenverarbeitung gliedert sich im Wesentlichen in vier Schritte. Zunächst werden durch die GenePix Software die Rohdaten ausgelesen. In diesem Schritt wird der Objektträger durch den Scanner auf Fluoreszenz abgetastet und die daraus entstehende Information über die Verteilung der Fluoreszenz auf dem Objektträger durch die Software als Bild dargestellt. Die für jedes Microarray spezifische Kartierung der Sonden (*gene array list*) wird dann in die Software geladen und auf das erhaltene Bild angepasst (sog. *gridding*, Abbildung 2.2). Die Software errechnet dann an für jede Sonde einen Intensitätswert (Vordergrundintensität), welcher dann in die weitere Analyse eingeht. Auch für Stellen, an denen keine Sonde liegt werden Intensitätswerte berechnet, welche unspezifische Hybridisierung oder Fluoreszenz des Objektträgers messen (Hintergrundintensität). Es entsteht eine Tabelle mit Intensitätswerten verschiedener Spots z.B. von microRNAs. Mit Hilfe eines selbst erstellten Scriptes werden die erhaltenen Daten in R eingelesen, die Hintergrund- von der Vordergrundintensität subtrahiert. Dann wird eine Normalisierung durchgeführt, welche die methodisch bedingte technische Varianz minimieren soll. Hierfür existieren verschiedene Methoden; Folgende wurden benutzt und verglichen:

- Median-Normalisierung: Die Mediannormalisierung wird für jedes Array bzw. jeden Farbkanal getrennt durchgeführt. Jeder Intensitätswert wird durch den Median dividiert und so die Skalierung angepasst.
- Varianz-stabilisierende-Normalisierung (VSN): Diese Methode wurde von Huber et al. 2002 für Microarrays etabliert¹⁰⁴ und beruht auf der Beobachtung, dass für kleine Intensitätswerte die Streuung (Varianz) im Vergleich zu hohen Intensitätswerten größer ist. Ausgehend von der Annahme, dass die tatsächliche biologische Varianz dieser Abhängigkeit nicht unterliegt, werden die Varianzen so stabilisiert, dass ein konstantes Signal-Rausch-Verhältnis resultiert. Die Funktion ist im Paket *vsn* für R implementiert.
- Quantilen-Normalisierung: Eine Quantilen-Normalisierung gleicht die Verteilung von Intensitätswerten innerhalb einer Gruppe von Microarrays untereinander an. Hierbei wird eine Versuchsreihe von n Arrays zusammen betrachtet. Innerhalb eines jeden Arrays von 1 bis n werden die Intensitätswerte der Größe nach sortiert. Dann wird der Mittelwert der Intensitätsränge 1 bis i gebildet und die Intensitätswerte der Ränge 1 bis i durch die

Materialien und Methoden

Mittelwerte M_1 bis M_i ersetzt. Jedes Array 1 bis n hat nach einer Quantil-Normalisierung also die gleiche Verteilung der Werte.

- Lokale lineare Regression (Loess): Dieses Modell erfordert im Gegensatz zu den anderen Methoden ein Zwei-Farben-Array. Ausgehend von der Annahme, dass differentiell exprimierte Gene gleichförmig über alle Intensitäten verteilt sind, werden die gemessenen Werte um die lokale Regression korrigiert. Zunächst werden die *log ratios* (M-Wert, $M = \log_2[\text{rot}] - \log_2[\text{grün}]$) und die mittlere log-Intensität (A-Wert, $A = 1/2 [\log_2(\text{rot}) + \log_2(\text{grün})]$) berechnet. Anhand der daraus berechneten Abhängigkeit zwischen M und A wird ein lokales lineares Regressionsmodell errechnet und die Intensitätswerte um die diese Regression korrigiert.

Je nach gewählter Normalisierung werden die Intensitätswerte vor der Normalisierung zur Basis 2 logarithmiert (VSN-,Quantil-Normalisierung) oder danach (Median-Normalisierung, Loess).

Nun werden die Daten statistisch ausgewertet und visualisiert. Für etwaige regulierte microRNAs kann in gängigen Datenbanken nach möglichen Zielgenen gesucht werden (s.u. und 1.4.3).

2.8.2 Online Ressourcen

Adresse	Inhalt
miRBase ^{33,38} http://www.mirbase.org	miRNA Datenbank und Zielgenvorhersage
TargetScan ³⁴ http://www.targetscan.org	miRNA Zielvorhersage
miRanda ⁴⁹ http://www.microrna.org	miRNA Zielvorhersage
PicTar ⁵⁰ http://pictar.mdc-berlin.de	miRNA Zielvorhersage
TarBase ^{53,54,105} http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/	miRNA-Zieldatenbank mit validierten Zielgenen
The Comprehensive R Archive Network http://cran.r-project.org	R Software, Pakete, Dokumentation
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes http://www.genome.jp/kegg	Pathways

Materialien und Methoden

Bioconductor http://www.bioconductor.org	Open Source Software für Bioinformatik
---	--

2.9 Geräte

Genannt werden an dieser Stelle lediglich Geräte, die von der gewöhnlichen Laborausstattung abweichen und u.U. von Bedeutung für die produzierten Ergebnisse sein könnten.

Produkt	Firma
Nanodrop ND-1000	Nandodrop Technologies (Wilmington, USA)
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies (Böblingen)
Axon Genepix 4100A Array Scanner	Molecular Devices (Sunnyvale, USA)
Hybridisierungssofen mit Rotation	Hybaid (Heidelberg)
ABI 7900HT	Applied Biosystems

2.9.1 Software

Produkt	Firma
Genepix V6.0	Axon
R for Statistical Computing Pakete: vsn, affy, limma	R-Project
Nanodrop Software	Nanodrop Tec.
Bioanalyzer Expert 2100 Software	Agilent

3 Ergebnisse

3.1 Technische Etablierung der Methode

3.1.1 Probenaufreinigung / RNA-Extraktion

Um bestmögliche Voraussetzungen an Qualität und Quantität der RNA-Proben für Microarrays zu schaffen, wurden die Extraktion mit Siliziumdioxid-Säule und die Präzipitation ohne Säule miteinander verglichen. Beide Methoden basieren auf der Verwendung eines Phenol-Guanidin Lysepuffers und extrahieren die Gesamt-RNA. Eine selektive Anreicherung der miRNAs wurde nicht vorgenommen. Als Zellmaterial dienten interstitielle Lungenfibroblasten und NIH-Zellen.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass die quantitative Ausbeute der RNA mit beiden Methoden etwa gleich ist. Die qualitative Analyse mit dem Agilent-Bioanalyzer ergab ebenfalls gleichwertige Ergebnisse in Bezug auf die RNA-Integrität (RIN). Zu beobachten war jedoch eine stabileres Absorptionsspektrum der säulengereinigten

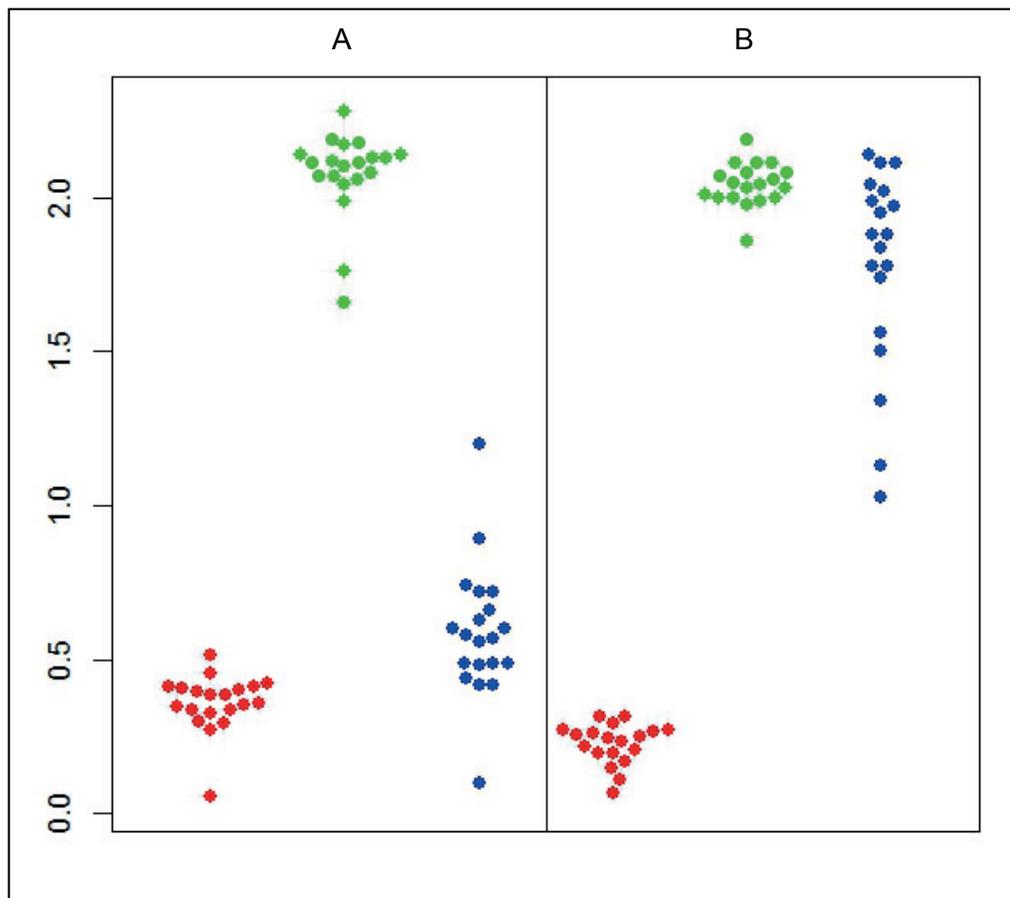


Abbildung 3.1 Probencharakteristika abhängig vom Waschprotokoll

(A) vor und (B) nach intensivem Waschprotokoll. Rot: RNA-Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$), Grün 260/280nm Quotient, Blau 260/230nm Quotient

Ergebnisse

Probe mit Verhältnissen von 260nm/280nm und 260nm/230nm mit geringfügiger Streuung um den geforderten Wert 2 für beide Quotienten. Für die Präzipitation wurden regelhaft Werte von <1 für den 260nm/230nm-Quotienten gemessen, der 260nm/280nm-Quotient war ähnlich dem der Säulenaufreinigung. Ausgehend davon, dass es sich um unerwünschte Verunreinigungen handelt, wurden die präzipitierten Proben erneut zweimal mit Alkohol gefällt und dabei jeweils viermal mit 80%igem Ethanol (v/v) gewaschen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

Man sieht, dass sich der Wert für die 260/230 Ratio deutlich in Richtung des gewünschten Wertes 2 verschiebt und die RNA-Konzentration bei dem Vorgang nur minimal abnimmt.

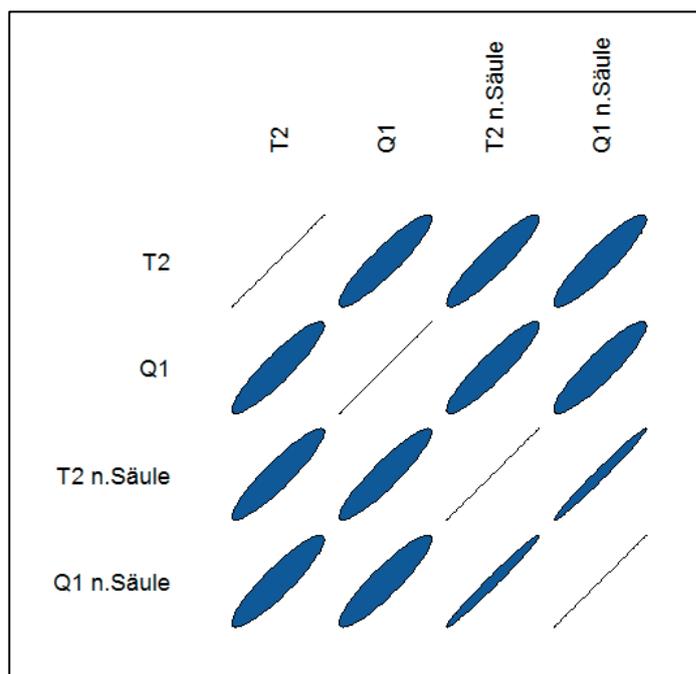


Abbildung 3.2 Korrelation vor und nach Säulenaufreinigung

Positive Korrelationswerte blau, Negative rot. Je schmaler die Ellipse, desto höher der Korrelationskoeffizient. T2 und Q1: Probenamen

nimal abnimmt.

Um zu analysieren, ob die Säulenaufreinigung jedoch einen Einfluss auf die microRNAs haben könnte¹⁰⁶, wurde die RNA einer Kulturschale NIH Zellen zunächst ohne Säule extrahiert, dann zur Hälfte mit einer Säule weiter aufgereinigt. Beide Proben wurden auf jeweils ein Microarray hybridisiert und die Ergebnisse verglichen. In Abbildung 3.3 sind die Perzentilen der fünf häufigsten miRNAs im Versuch ohne Säule (orange) im Vergleich zu den Perzentilen nach Säulenaufreinigung (blau) dargestellt. Hierbei kann festgestellt werden,

dass nach Säulenaufreinigung selektiv niedrigere Intensitäten für die dargestellten microRNAs vorhanden sind. Dazu passend zeigt sich in der Darstellung zweier unabhängig voneinander ohne Säule extrahierten NIH RNA-Proben im Vergleich zu selbigen Proben nach der Säulenaufreinigung in der Microarray-Analyse eine höhere Korrelation der beiden Proben gegeneinander. Der Korrelationskoeffizient zwischen der beiden Proben Q1 und T2 beträgt zunächst 0,915, nach der Säulenaufreinigung 0,988. Visualisiert ist diese Tatsache in Abbildung 3.2: Je schmaler die Ellipse, desto höher ist die Korrelation zwischen den Ergebnissen. Verwendet wurden die quantilnormalisierten, zur Basis 2 logarithmierten und hintergrundkorrigierten Intensitätswerte.

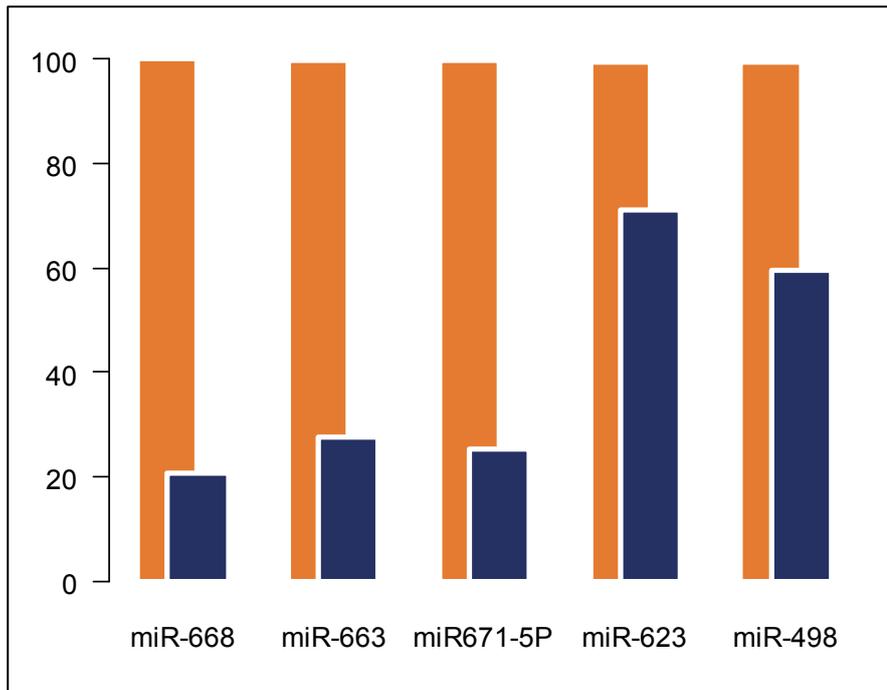


Abbildung 3.3 Perzentilen vor und nach Säulenaufreinigung

X-Achse: Perzentilen, y-Achse: miRNAs. Darstellung der fünf am miRNAs mit der höchsten Intensität nach Säulenaufreinigung und folgender Hybridisierung (orange). Der Intensitätswert von miR-668 entspricht dem 100. Perzentil. Entsprechende Perzentile für gleiche miRNAs nach Säulenaufreinigung und Hybridisierung (blau).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Präzipitation ohne Säule als Methode der Wahl für die weiteren Mikroarray-Versuche etabliert. Ein hierfür durchgeführter Vergleich zwischen den Lysepuffern QIAzol der Fa. Qiagen und TRIzol der Fa. Invitrogen ergab keine messbaren Unterschiede in Bezug auf Qualität und Quantität der extrahierten RNA.

3.1.2 Markierung der micro-RNA / Labelling

Zum Vergleich des Labellings im Protokoll nach Castoldi⁸⁶ und nach dem Exiqon miRCURY Power Labelling Kit® wurden je 2µg der mit Fällung nach dem Castoldi-Protokoll extrahierten RNA des Donors Gi-150 (humane, interstitielle Fibroblasten, QIAzol statt TRIzol) einfarbig mit Cy3 bzw. Hy3 (Exiqon) auf je einem miChipMicroarray nach dem Castoldi-Protokoll hybridisiert. Dabei zeigte sich eine mehr als doppelt so hohe mediane Vordergrundintensität für das Castoldi-Protokoll als für das Exiqon-Protokoll (siehe Abbildung 3.4). Aufgrund des eindeutigen Ergebnisses und bereits vorher aufgetretenen Problemen schwacher Gesamtintensität nach dem Exiqon-

Ergebnisse

Protokoll wurde für weitere Microarrays das Labelling nach dem Castoldi-Protokoll durchgeführt.

In den ersten größeren Versuchsreihen zeigten sich im weiteren Verlauf einzelne Proben mit deutlich verminderten Intensitätswerten verglichen zu anderen, bis hin zu einzelnen Versuchen, in welchen die Vordergrundintensität nur unwesentlich die Hintergrundintensität überstieg. Diese Beobachtung konnte auch in der Wiederholung des entsprechenden Versuches gemacht werden. Da anhand der gegebenen Qualitätskriterien (RIN, Nanodrop) keine Unterschiede der schlecht funktionierenden Proben im Vergleich zu den gut funktionierenden Proben identifiziert werden konnten, wurde zunächst mit Hilfe des Bioanalyzers (Fa. Agilent) eine Kapillarelektrophorese für kleine RNAs durchgeführt, um den microRNA-Gehalt der Proben zu bestimmen. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den funktionierenden und schlecht funktionierenden Proben, alle enthielten eine zu erwartende Menge an microRNAs (mittlerer microRNA-Anteil an der Gesamt-RNA-Fraktion 4,1%, Standardabweichung 2,3%). Erst die Etablierung des im vorangehenden Abschnitt beschriebenen rigorosen Waschprotokolls stabilisierte das Labelling für alle Proben auf gleich hohem Niveau. Die Abbildung 3.5 zeigt diese Tatsache auf: Dargestellt sind die zur Basis 2 logarithmierten, hintergrundkorrigierten Intensitätsverteilungen im Boxplot. In dem oberen Dia-

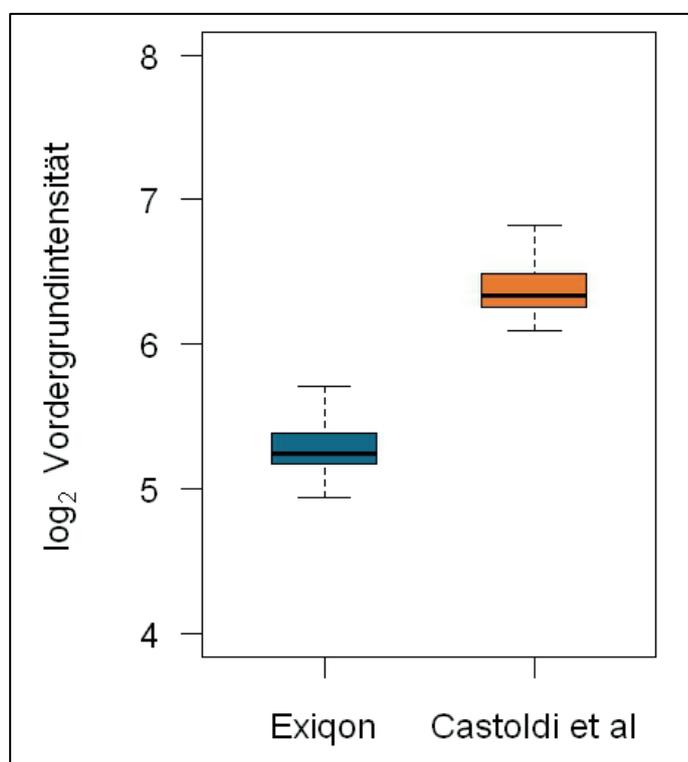


Abbildung 3.4 \log_2 der Vordergrundintensitäten

Exiqon-Labelling (blau), Castoldi-Labelling (orange).

gramm wurde die Extraktion mit Fällung exakt nach dem Castoldi-Protokoll durchgeführt (14 miChip Microarrays V.9.2.), die Proben im unteren Diagramm (19 miChip Microarrays V.11.0) beinhalten das rigorose Waschprotokoll mit zusätzlicher zweifacher Fällung und jeweils vierfacher Waschen mit 80% (v/v) Ethanol. Man sieht die deutliche Stabilisierung der Intensitätsverteilung zwischen den Proben im unteren Diagramm auf dem Niveau der Proben mit höherer Intensität in dem oberen Diagramm. In der Zusammenschau mit den Ergebnissen aus Tabel-

Ergebnisse

le 1 ist daher das erneute Fällern und Waschen als Standard für ohne Säule extrahierte RNA-Proben vor dem Labelling etabliert worden.

Das Castoldi-Protokoll empfiehlt aufgrund der Stabilitätsprobleme mit dem ozonsensitiven Farbstoff Cy5 ein einfarbiges Labelling mit Cy3. Derartige Probleme konnten im Rahmen der ersten zweifarbigen Versuchsreihe bestätigt werden. Daher wurde der Versuch durchgeführt, das Cy5-Signal bei 635nm zu stabilisieren, um den Vorteil von zweifarbigen Arrays für bestimmte Versuchsreihen ausnutzen zu können. Angelehnt an das von der Firma Agilent entwickelte Verfahren zur Prozessierung zweifarbiger mRNA-Microarrays, wurden die MiChip Microarrays in dieser Versuchsreihe im Anschluss an das eigentliche Waschprotokoll zusätzlich 1min in Acetonitril und danach 30s in der Agilent Stabilization and Drying Solution getaucht. Benutzt wurde die mittels Fällung extrahierte RNA aus einer Schale NIH Zellen. Diese Probe wurde in 4x 2µg RNA aufgeteilt, je zweimal mit Cy3 und zweimal mit Cy5 markiert und anschließend je ein Cy3/Cy5-Paar auf einem MiChip Microarray (V.9.2.) hybridisiert (Array 1 und Array2). Durch dieses Verfahren zeigte sich eine deutliche Stabilisierung des Cy5-Signals annähernd auf dem guten Niveau des Cy3-Signals bei 532nm. Zu erwarten wären bei Gleichwertigkeit des Farbstoffes und der Hybridisierung nach Normalisierung M-Werte um Null. Im MA-Plot (Abbildung 3.6 oben) zeigte sich jedoch für beide Mikroarrays eine für eine sog. self-self Hybridisierung untypische Streuung der Punktwolke von 2 bis -2, was einer Schwankung der M-Werte um den Faktor vier entspricht. Im Vergleich des Rotkanals aus Array 1 und des Grünkanals aus 2 bzw. des Grünkanals aus 1 und Rotkanals aus 2 zeigt sich das entsprechende Bild (Abbildung 3.6 unten). Im Vergleich der beiden Cy5 und Cy3 Signale untereinander (Abbildung 3.6 Mitte) konnte eine Reduzierung dieser Streuung auf ein zu erwartendes Maß beobachtet werden: die Punktwolke nähert sich der x-Achse an, die Residualstreuung entspricht einer technischen Varianz zweier parallel durchgeführter Mikroarray-Versuche (Hybridisierungsvarianz). Die gewählte Farbe (Cy3 oder Cy5) hat also einen deutlichen Effekt auf das zu erwartende Ergebnis (Varianz durch den Farbstoff > Hybridisierungsvarianz). Daher wurden die weiteren Versuchsreihen einfarbig mit Cy3 durchgeführt.

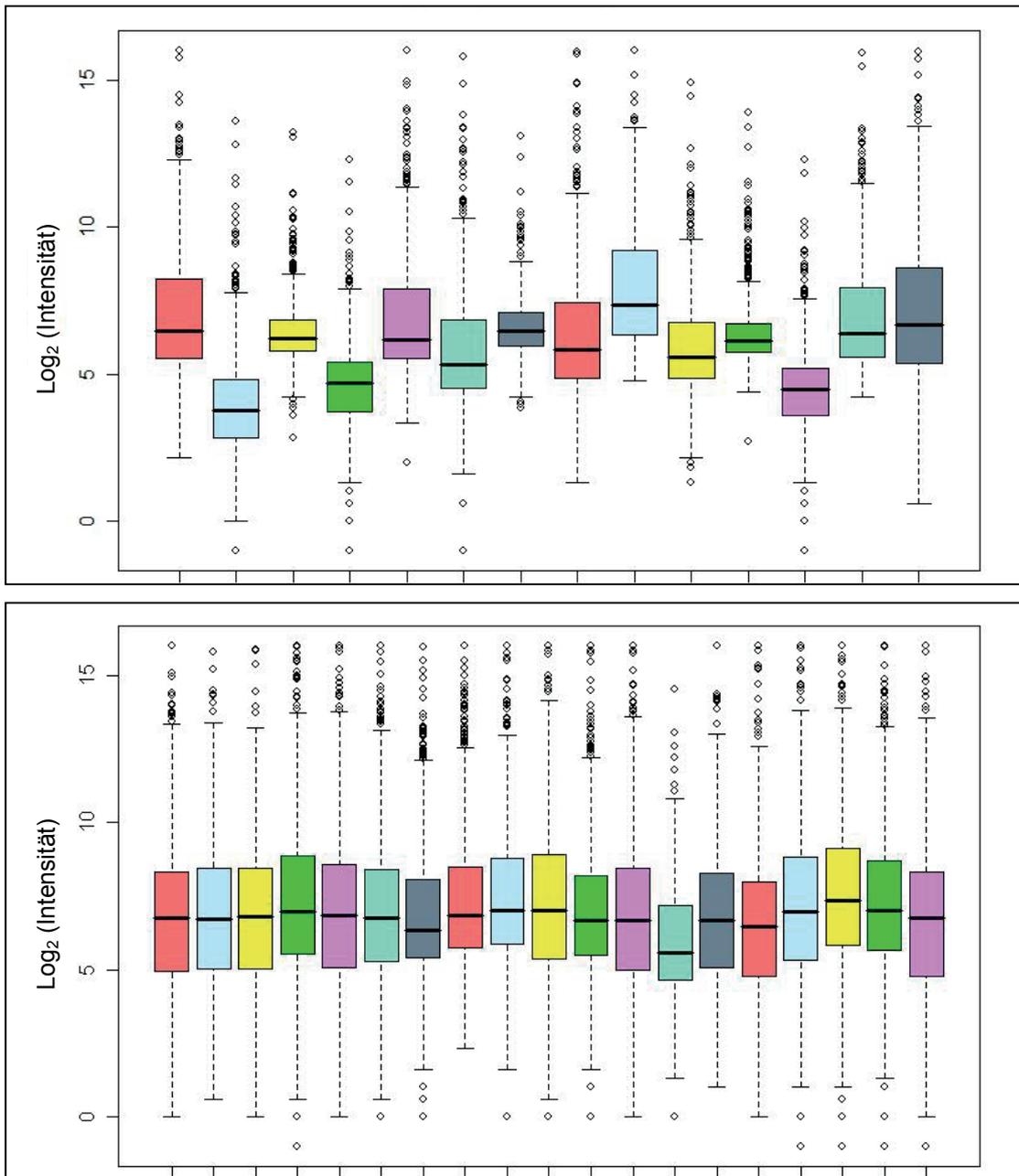


Abbildung 3.5 Intensitätsverteilungen abhängig von erneutem Waschen

Summierte Intensitäten (Boxplot aller Intensitätswerte des entsprechenden Microarrays) vor (oben) und nach erneutem Waschen (unten).

Ergebnisse

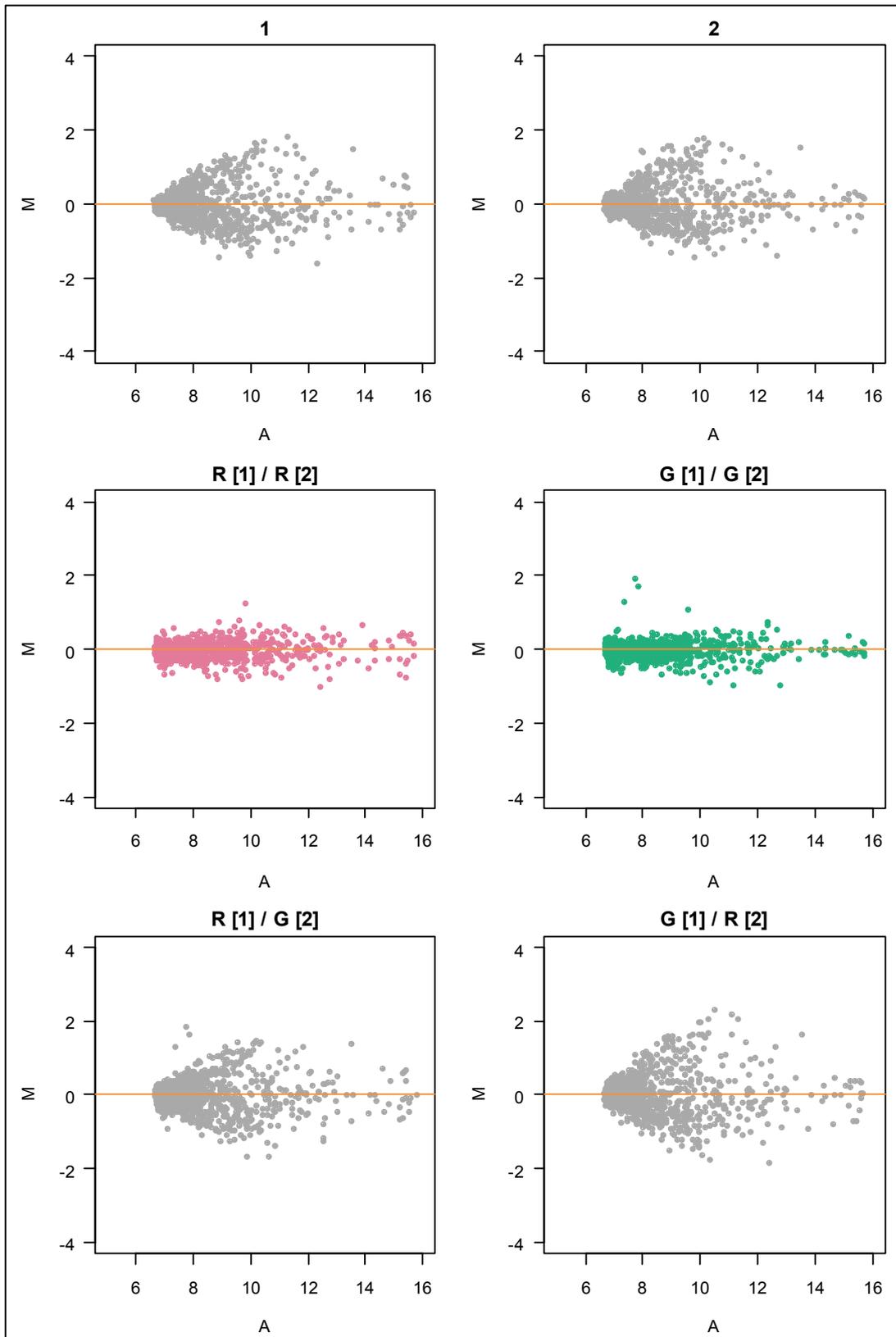


Abbildung 3.6 Analyse des Farbeffektes bei zweifarbiger Hybridisierung

MA-Plots der Probe 1 und 2 (oben), des Rot- und des Grünkanals beider Proben jeweils gegeneinander (Mitte, rot links, grün rechts) und des Rotkanals gegen den Grünkanal der anderen Probe (unten).

3.1.3 Vergleich verschiedener Microarray-Hersteller

Die Evaluation der Microarray-Plattform umfasst zunächst die Vergleiche der Hersteller Miltenyi mit dem miRXplore™ Microarray und Exiqon mit dem miRCURY LNA™ Microarray. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde für den Versuch auf beiden Plattformen jeweils zweimal 0,5µg RNA humaner interstitieller Lungenfibroblasten (Donors Gi-150) streng nach dem Exiqon Labelling- und Hybridisierungsprotokoll mit den Exiqon Farbstoffen Hy5 (635nm) und Hy3 (532nm) markiert und anschliessend nach Herstellerprotokoll auf dem Microarray hybridisiert (sog. *self-self* Hybridisierung).

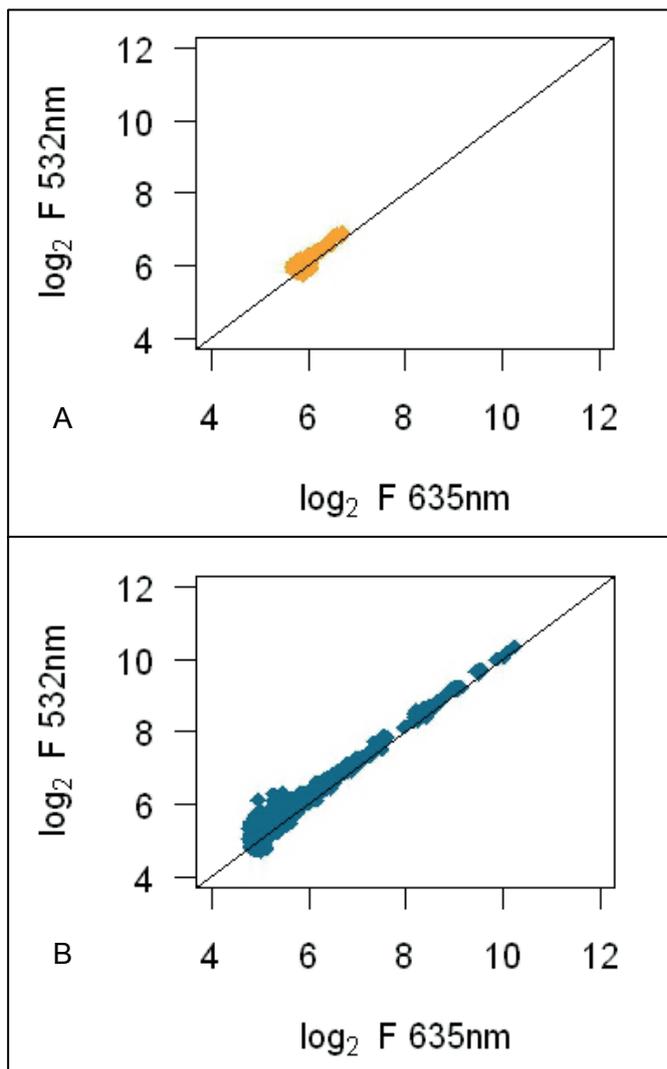


Abbildung 3.7 Intensitätsverteilung *self-self* Hybridisierung Exiqon/ Miltenyi

Graph A: Miltenyi miRXplore™, Graph B: Exiqon miRCURY LNA™. Labelling mit Exiqon-Protokoll. Dargestellt ist der \log_2 der Intensitäten für Cy3 (532nm) und Cy5 (635nm)

Zur Qualitätsbeurteilung wurden die Vordergrund- und die Hintergrundintensitäten herangezogen. Da pro Objektträger die gleiche Probe in verschiedenen Farben hybridisiert wurde, kann auch die Linearität der Punktwolke als weiterer Maßstab benutzt werden. Hier zeigt sich auf dem Exiqon-Slide (Abbildung 3.7B) eine erkennbare Linearität mit logarithmierten Spitzenintensitäten von etwa 11. Die durchschnittliche logarithmierte Hintergrundintensität beträgt weniger als 5 (*signal-to-noise-ratio* bzw. SNR 1,14). Mit dem gleichen Verfahren zeigen sich für den Miltenyi Slide (Abbildung 3.7A) ein logarithmiertes Intensitätsmaximum von etwa 7 bei Hintergrundintensitäten von etwa 6 (SNR 1). Die Linearität lässt sich aufgrund der geringen Vordergrundintensitäten und der daraus resultierenden fehlenden Verteilungsbreite der Punktwolke auf beiden Achsen kaum beurteilen.

Ergebnisse

Die Miltenyi-Plattform zeigt also unter gleichen Bedingungen geringere Spitzenintensitäten, entsprechend eine geringere Verteilungsbreite bei gleichzeitig höheren durchschnittlichen Hintergrundwerten. Auch die Wiederholung des Versuches ergab entsprechende Ergebnisse. Des Weiteren verwendet die Firma Miltenyi ein nicht zu Agilent Sure-Hyb™-Hybridisierungskammern passendes Format des Objektträgers. Daher wurde dieses Microarray nicht weiter verwendet.

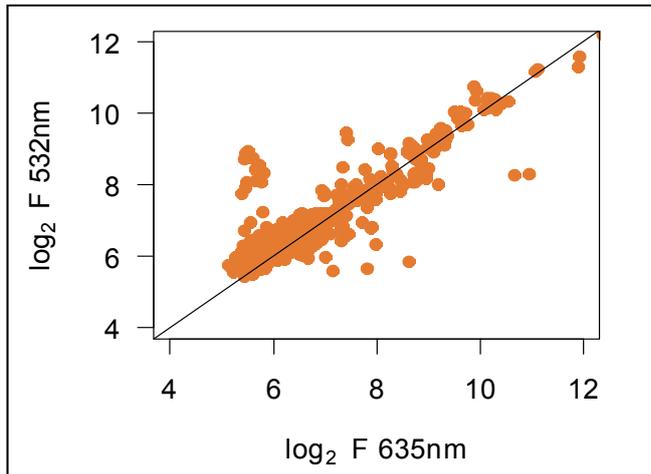


Abbildung 3.8 *self-self* Hybridisierung auf dem miChip

Parameter entsprechend Abbildung 3.7 gewählt.

Abbildung 3.8 zeigt (Hybridisierung humaner interstitieller Fibroblasten Normoxie gegen Hypoxie). Man sieht, dass die Vordergrundintensitäten auf dem Niveau des Exiqon-Arrays liegen (Maximum etwa 12), der Hintergrund liegt auf dem Niveau des Miltenyi-Arrays, kann jedoch durch die stabil hohen Vordergrundintensitäten kompensiert werden (SNR 1,18).

Weiterhin zum Vergleich mit dem Exiqon miRCURY LNA™ stand das auf einem Exiqon LNA™ Sondenatz basierende MiChip Microarray, zunächst in der Version 9.2. Aufgrund von bereits in der Einführungsphase absolut zufriedenstellender Ergebnisse wurde auf einen systematischen Vergleich mit dem Original Exiqon Microarray verzichtet und das miChip Microarray für weitere Versuche verwendet. Exemplarisch zum Vergleich mit Abbildung 3.7 sei die

3.2 Etablierung einer Auswertung

Die Entwicklung einer standardisierten Auswertung ist bei den großen Datenmengen, die durch Microarrays produziert werden eine wichtige Komponente des Ablaufs. Daher liegt hier ein besonderer Focus dieser Arbeit und die diesbezüglichen Ergebnisse werden im Folgenden ausführlich dargestellt. Als Grundlage dienen die Experimente 0 (Pulmonalarterienfibroblasten unter Hypoxie) und 3.4 (Mausmyokard-Infarktversuch).

3.2.1 Hintergrundkorrektur

Nach dem Scannen des Microarrays liegen zunächst die Intensitätsrohdaten für Vorder- und Hintergrund vor. Im R Paket limma stehen nun verschiedene Methoden zur Verfügung, die Vordergrundintensitätswerte um den Hintergrund zu korrigieren. Abbildung 3.9 zeigt die zusammengefassten Standardfehler der Intensitäten humaner miRNAs der Pulmonalarterienfibroblasten (siehe 0) für die Hintergrundkorrekturen *normexp*, *subtract*, *minimum* und *half* bei nicht-normalisierten, quantil- und VSN-normalisierten Daten. In der Analyse der Signifikanzniveaus (zweifaktorielle Anova)

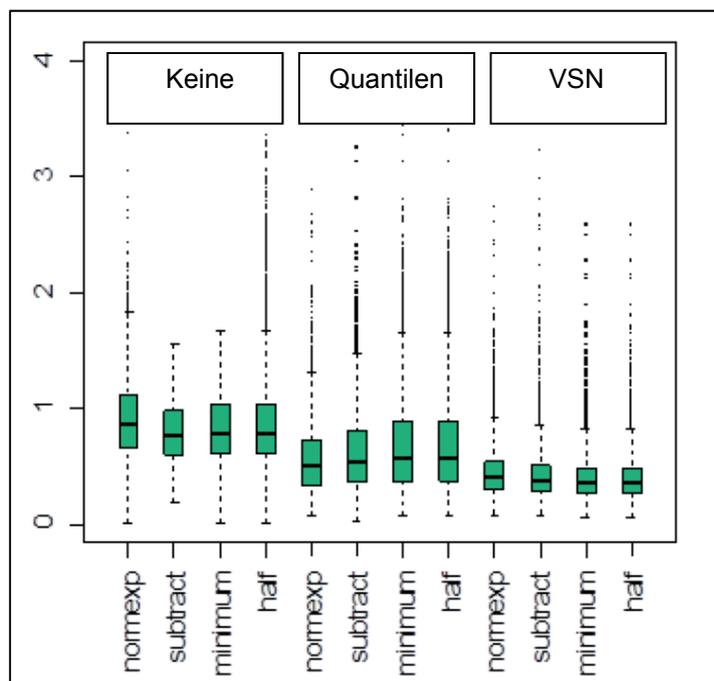


Abbildung 3.9 Zusammengefasste Standardfehler

Boxplots der zusammengefassten Standardfehler (y-Achse) für verschiedene Hintergrundkorrekturen (x-Achse) und Normalisierungsmethoden (Legende oben). Daten des Pulmonalarterienfibroblasten-Experiments.

Ergebnisse

zeigte sich ein signifikanter Effekt der gewählten Normalisierung und der Hintergrundkorrektur, jedoch keine Interaktion, d.h. eine Auswirkung der gewählten Hintergrundkorrektur auf die Normalisierung ist nicht nachweisbar (siehe Tabelle 3.1).

	Df	Quadratsumme	Mittel der Quadratrate	F-Wert	Pr(>F)
Hintergrundkorr.	1	38439	38439	111305	0
Normalisierung	1	410	410	1190	5,87E-258
Hintergrundkorr.:Normalisierung	1	0,61	0,61	1,76	0,19
Residuen	53692	18542	0,35		

Tabelle 3.1 **Zweiseitige Anova Normalisierung / Hintergrundkorrektur**

3.2.2 Normalisierung und Teststatistik

Bei Betrachtung der Volcano-Plots der Pulmonalarterienfibroblasten-Daten aus 0 zeigen sich je nach gewählter Normalisierungsmethode deutliche Unterschiede (Abbildung 3.11 A); ohne Normalisierung kann auf korrigiertem Signifikanzniveau keine regulierte miRNA identifiziert werden, mit Quantil-, Loess- und VSN-Normalisierung je drei miRNAs, mit der Scale-Normalisierung eine. Sind viele miRNAs reguliert, wie bei den Maus-Myokard-Daten aus 3.4, sieht man, dass alle Normalisierungsmethoden einen stabilisierenden Effekt auf den sonst ungleich verteilten Datensatz haben (Abbildung 3.11 B).

Ausgehend davon, dass schlecht korrelierende Arraydaten die Normalisierung weniger effektiv machen, werden vom gesamten Maus-Myokard-Datensatz zunächst die Arrays mit dem niedrigsten Korrelationskoeffizienten innerhalb einer Gruppe gefiltert und danach der gefilterte Datensatz neu normalisiert. Dieses Verfahren wird angewendet, bis innerhalb einer Gruppe kein Versuch mehr mit den Anderen mit einem niedrigeren Korrelationskoeffizienten als 0,8 korreliert. Der Korrelationskoeffizient wird dabei anhand eines Korrelationsbildes farbcodiert abgebildet. Dargestellt sind der Anschaulichkeit halber lediglich das erste (Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13 links) und das letzte Korrelationsbild (Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13 rechts). Der Korrelationskoeffizient wird mit Hilfe der dazugehörigen Skalierung abgelesen. Man sieht, dass sich durch das beschriebene Verfahren die Korrelation zwischen den verbliebenen Arrays deutlich erhöht. Untersucht man weiterhin die Teststatistik bezüglich der Regulation von miRNAs im Vergleich zur Kontrolle, zeigt sich in der Zählung signifikant ($p_{\text{fdr}} < 0.05$,

Ergebnisse

Abbildung 3.10) regulierter miRNAs eine deutliche Erhöhung deren Anzahl in allen Gruppen nach dem Aussortierungsverfahren.

Die Verwendung eines moderierten t-Tests an Stelle des Standard t-Tests erhöht zusätzlich die Anzahl signifikant regulierter Gene (Abbildung 3.10).

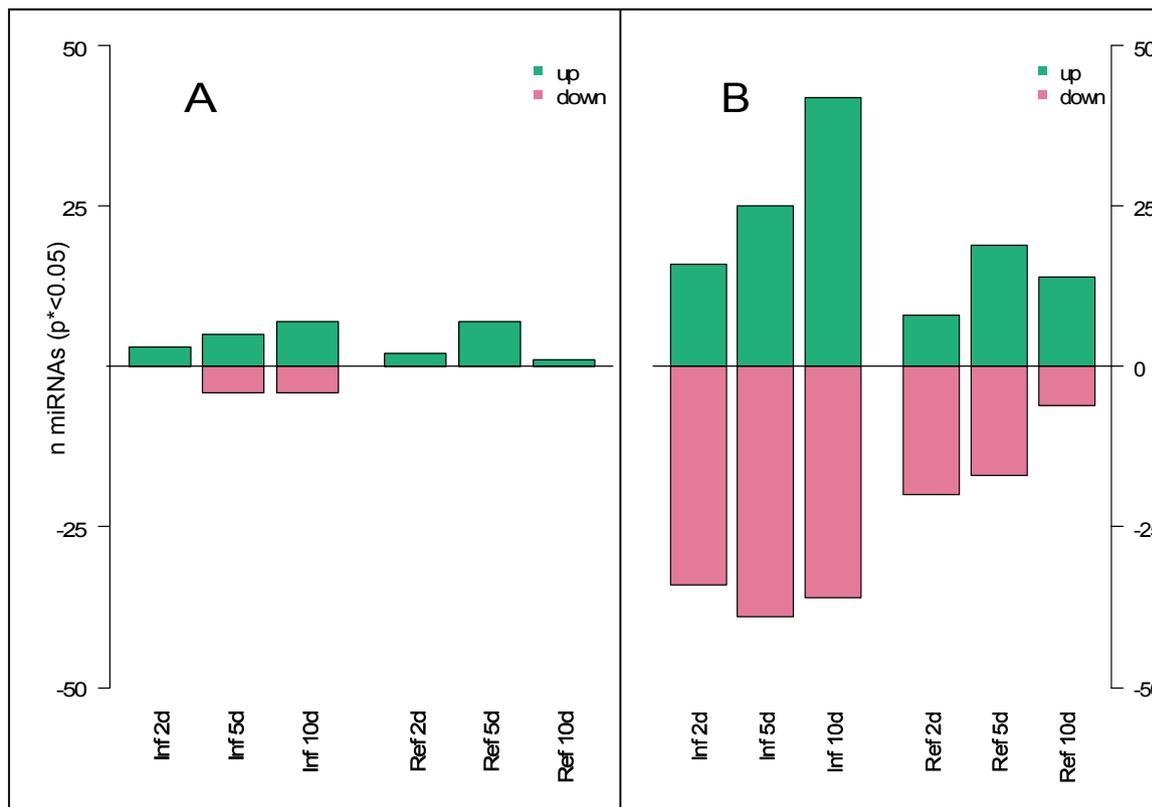


Abbildung 3.10 Anzahl signifikant regulierter miRNAs an angegebenen Zeitpunkten

A: t-Test, keine Aussortierung; B: moderierter t-Test, Aussortierung

Inf: Infarkt; Ref: Reflow

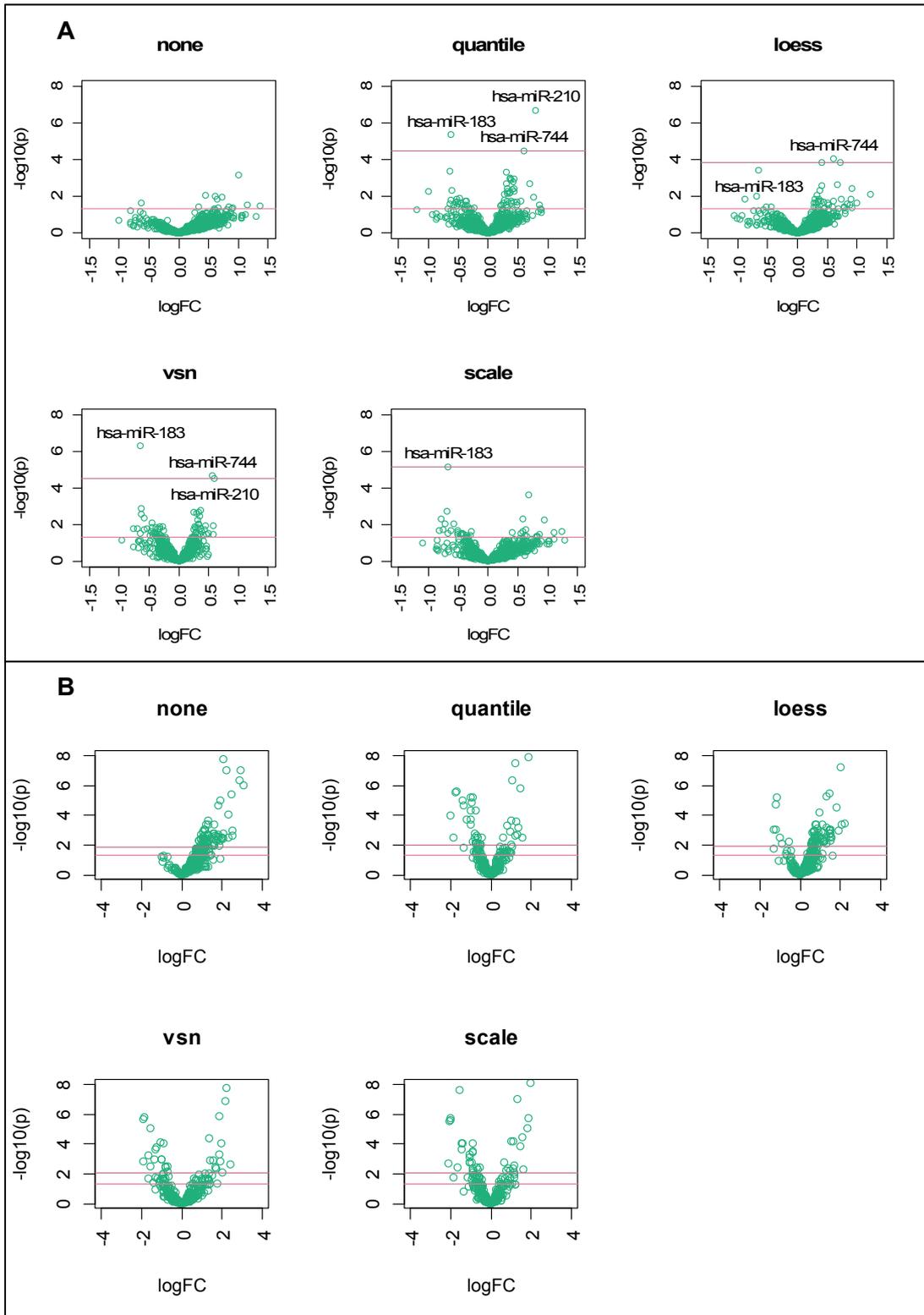


Abbildung 3.11 Volcano-Plots der verschiedenen Normalisierungsmethoden

A: Pulmonalarterienfibroblasten, B: Maus-Myokard

Untere rote Linie $p < 0,05$, obere Linie $p_{fdr} < 0.05$

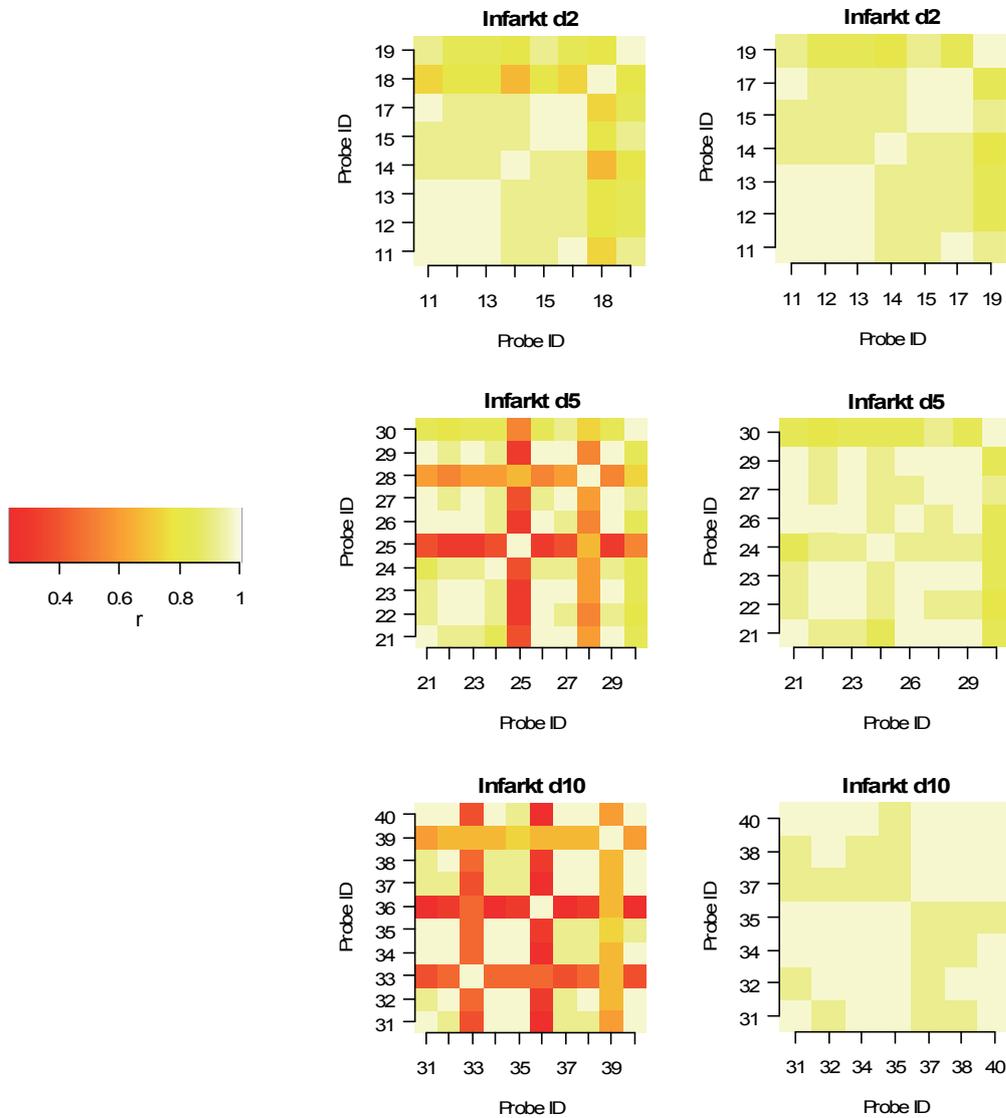


Abbildung 3.12 Korrelationsbild vor (links) und nach (rechts) Aussortierung

Jedes farbige Quadrat visualisiert die Korrelation zweier Hybridisierungen. Die Quadrate der aufsteigenden Diagonalen beziehen sich auf die Korrelation der Hybridisierungen mit sich selbst, entsprechend einem Wert von 1. Die Diagramme sind zu dieser Diagonalen symmetrisch. Der Korrelationskoeffizient kann mit Hilfe des Farbschlüssels (linksseitig) abgelesen werden.

Ergebnisse

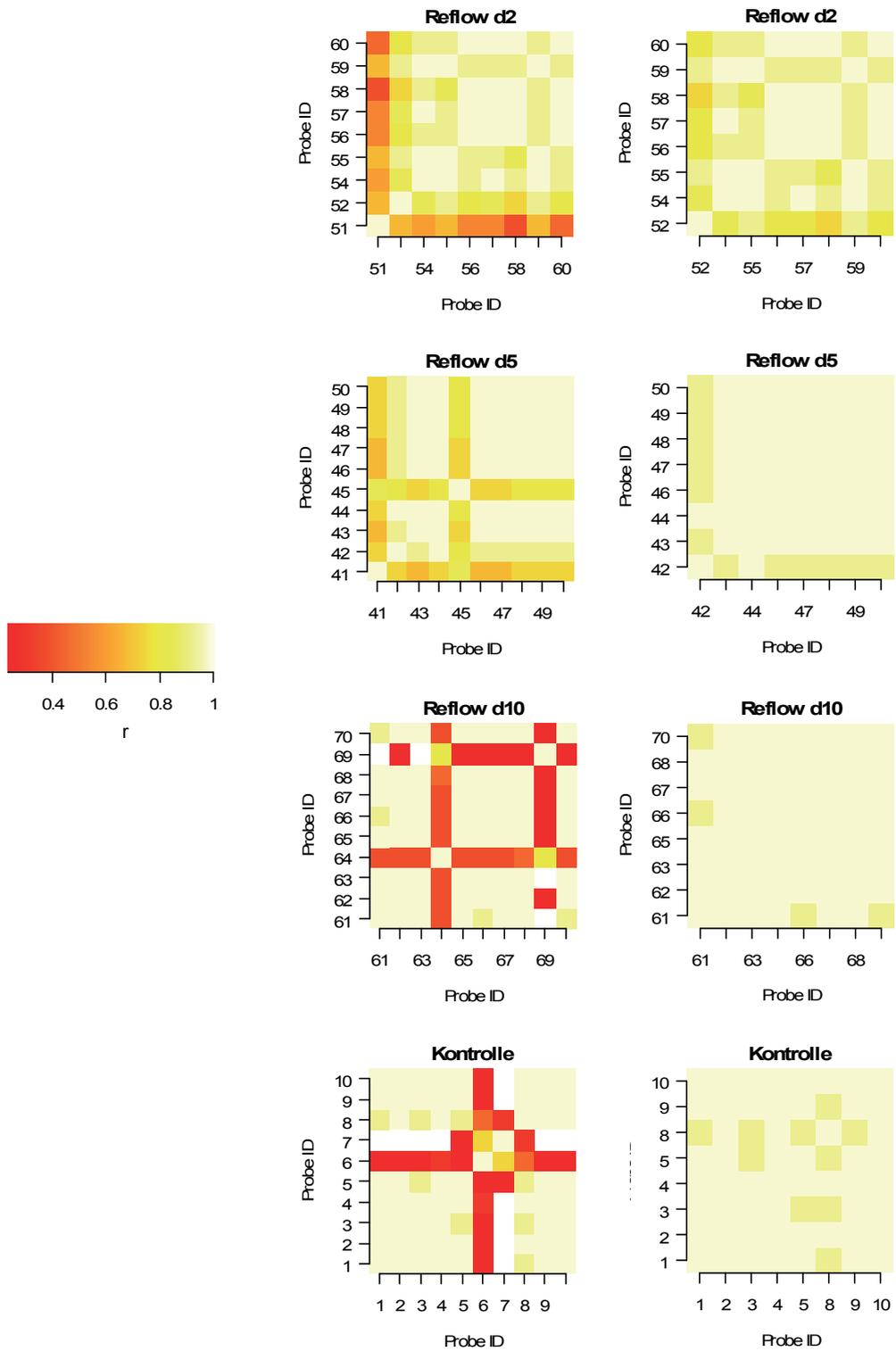


Abbildung 3.13 Fortsetzung der Abbildung 3.12

3.3 Versuchsreihe Pulmonalarterienfibroblasten

In diesem Versuch wurden humane Pulmonalarterienfibroblasten des Donors Gi-200 kultiviert und die Expression von miRNAs unter normoxischem Zustand mit deren Ex-

Probe	ΔC_t	RIN
H1	6,34	9,5
H2	6,97	9,4
H3	7,53	9,5
H4	6,64	9,7
H5	7,42	9,8
H6	6,58	9,7
H7	6,71	NA
H8	6,69	9,7
H9	6,64	10
N1	4,98	9,7
N2	3,97	9,8
N3	4,31	9,8
N4	4,56	9,7
N5	5,30	9,8
N6	4,25	9,8
N7	3,76	9,6
N8	4,64	9,8
N9	5,50	9,4
N10	4,93	9,7

Tabelle 3.2 ΔC_t / RIN

pression nach 24h Hypoxie verglichen. Verwendet wurden jeweils 10 Zellschalen, die Proben wurden von H1-H10 und N1-N10 durchnummeriert. Die Gesamt-RNA wurde unter Anwendung des intensivierten Waschprotokolls extrahiert. Die Extraktion der Probe H10 war nicht erfolgreich (zu geringer RNA-Gehalt durch teilweisen Verlust des Pellets), so dass für die Auswertung 10 Proben Normoxie und 9 Proben Hypoxie zur Verfügung standen. Die Qualität und Quantität der restlichen Proben entsprach den Qualitätskriterien (siehe Tabelle 3.2, die RIN der Probe H7 konnte von der Software nicht berechnet werden, zeigte aber sichtlich keine Zeichen der Degradation).

Mittels Real-Time-PCR wurde für jedes Normoxie-Hypoxie-Paar anhand der erhöhten Expression des Gens PGK1 überprüft, ob der Stimulus der Hypoxie auf Zellebene gewirkt hat. Als Referenzgen wurde PBGD benutzt. Dies war bei jeder Hypoxieprobe der Fall (siehe Tabelle 3.2, Erhöhung des ΔC_t um 1 entspricht einer Verdopplung des Ausgangsmaterials, $p < 0.05$. Grafische Darstellung in Abbildung 3.14).

Nun wurde jede Probe nach dem Castoldi-Protokoll einfarbig Cy3 auf einem MiChip V.11.0 hybridisiert. Die summierten und um den Hintergrund korrigierten Vordergrundintensitäten sind in allen Versuchen ähnlich auf hohem Intensitätsniveau als Beleg für eine erfolgreiche Hybridisierung (Abbildung 3.15).

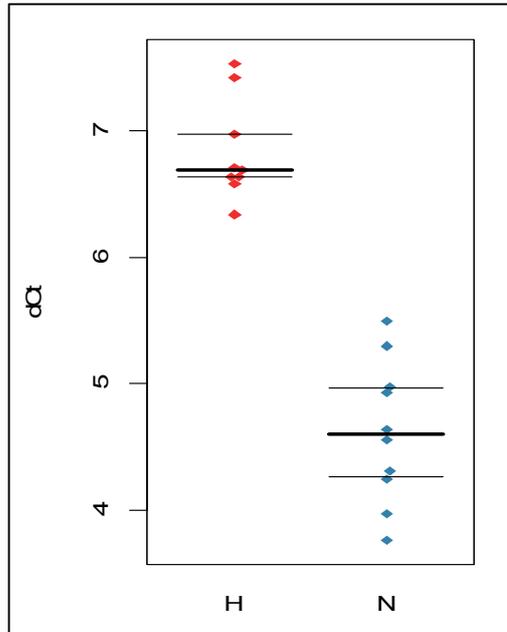


Abbildung 3.14 ΔC_t -Werte (dCt)

ΔC_t (PBGD – PGK1)

H: Hypoxie

N: Normoxie

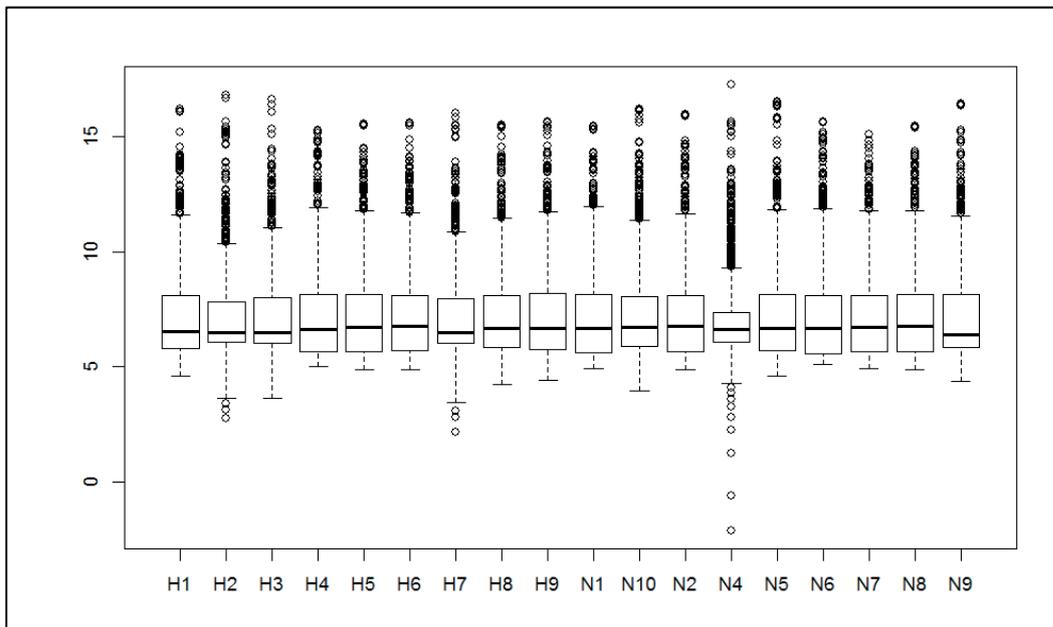


Abbildung 3.15 Summierte und korrigierte Vordergrundintensitäten

Versuchsreihe Pulmonalarterienfibroblasten

3.3.1 Biologische Ergebnisse der Versuchsreihe

Die Daten der Pulmonalarterienfibroblasten wurden entsprechend der entwickelten Auswertung um den lokalen Hintergrund korrigiert und nach der VSN-Methode normalisiert. Die Korrelation der Versuche innerhalb der Gruppe liegt in allen Versuchen höher als 0,8 (Abbildung 3.17). Die Ergebnisse für die einzelnen miRNAs sind in Tabelle 3.3 bis Tabelle 3.5 gezeigt. Der Übersichtlichkeit halber sind nur jeweils die Top 10 der regulierten (Tabelle 3.3), der meist abundanten (Tabelle 3.4) und der signifikant regulierten (Tabelle 3.5) miRNAs gezeigt. Zusätzlich zeigt Abbildung 3.16 einen Volcano-Plot der Daten. Bezogen auf den nach Benjamini und Hochberg¹⁰³ für multiples Testen korrigierten p-Wert (fdr) sind die miRNAs -210 (fdr=0,0002) und 744 (fdr=0,0089) hochreguliert, die Expression von miR-183 (fdr=0,018) supprimiert. Nach der Loess-Normalisierung ist miR-296-5p (fdr_{vsn}=0,2503) ebenfalls auf dem 5%-fdr-Niveau reguliert, weswegen diese miRNA in der Detailauswertung dargestellt wurde (Abbildung 3.19 und Abbildung 3.18).

Es folgte die Validierung der Array-Ergebnisse mittels miRNA-Real-Time-PCR. Als Referenz wurde der Mittelwert aus den beiden im Array am geringsten regulierten, jedoch deutlich exprimierten, miRNAs miR-525 und miR-510 sowie den im miScript-System mitgelieferten Kontrollen RNU1A_1, RNU5A_1, RNU6B_2 (small nuclear RNAs) und SNORD25_1 SNORA73A_1 (small nucleolar RNAs) verwendet. Zur Auswertung wurde die PCR-Platte mit den Proben H1 und N1 aufgrund einer, im Vergleich zum Gruppenmittelwert, deutlich schlechteren Korrelation zu den anderen Platten (Korrelationskoeffizient ~0.4, alle anderen >0,95) und die Platte mit den Proben H8 und N8 aufgrund einer starken Streuung der Referenzgene unklarer Ursache nicht berücksichtigt. Im einseitigen T-Test mit gepoolten Varianzen können dann miR-210, -183 und -744 auf dem 5%-fdr-Niveau als reguliert bestätigt werden, miR-296 ist auf dem 10%-fdr-Niveau reguliert (Abbildung 3.19).

Ergebnisse

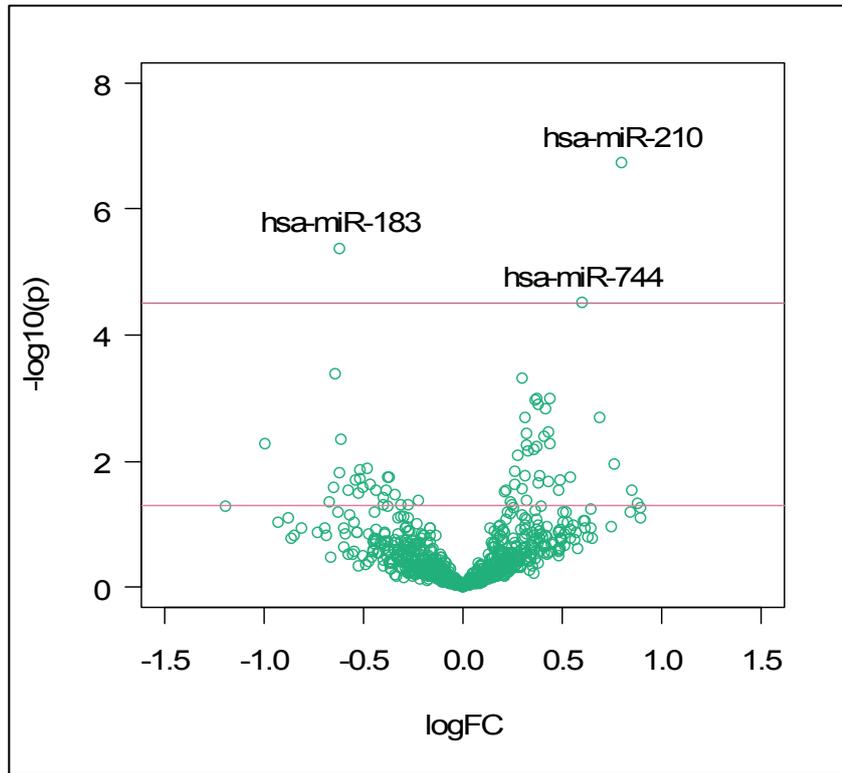


Abbildung 3.16 Volcano Plot Normoxie / Hypoxie

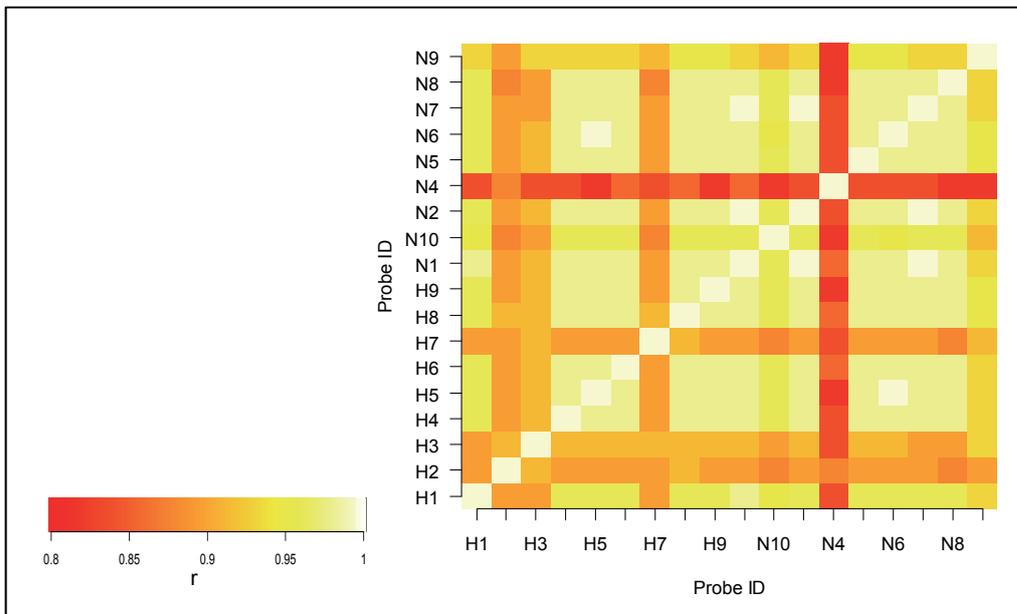


Abbildung 3.17 Korrelationsbild Versuch Pulmonalarterienfibroblasten

Minimum 0,82 (Versuch N4)

Ergebnisse

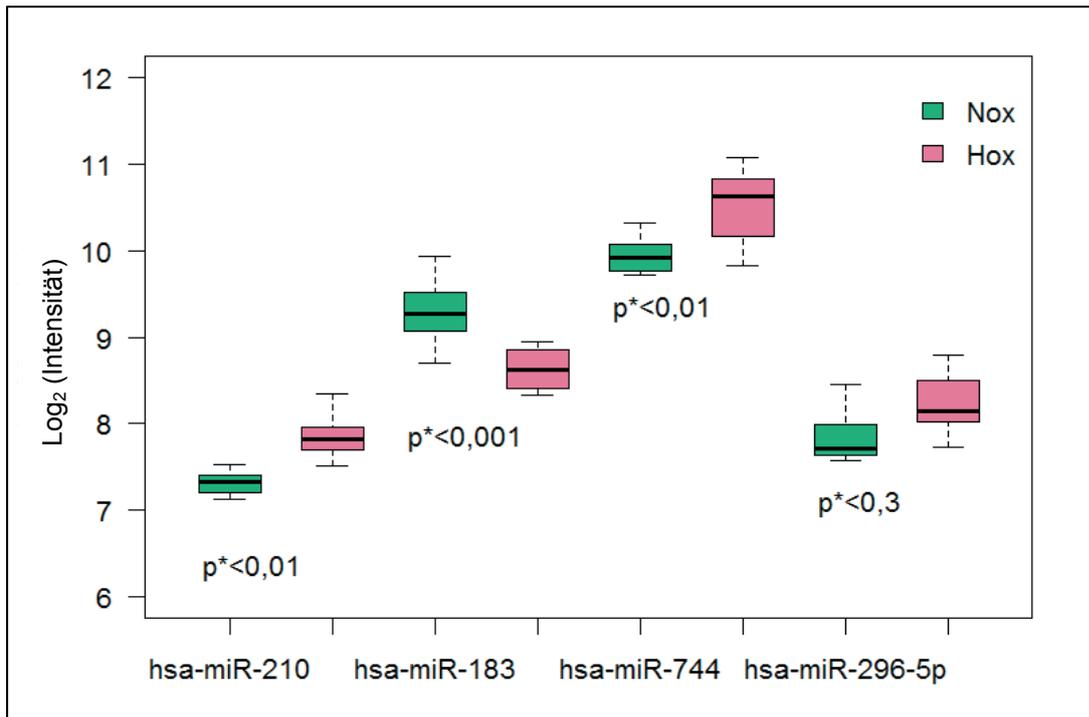


Abbildung 3.18 Signifikant regulierte miRNAs im Microarray

Korrigierte p-Werte nach VSN-Normalisierung, miR-296-5p nur für Loess-Normalisierung signifikant

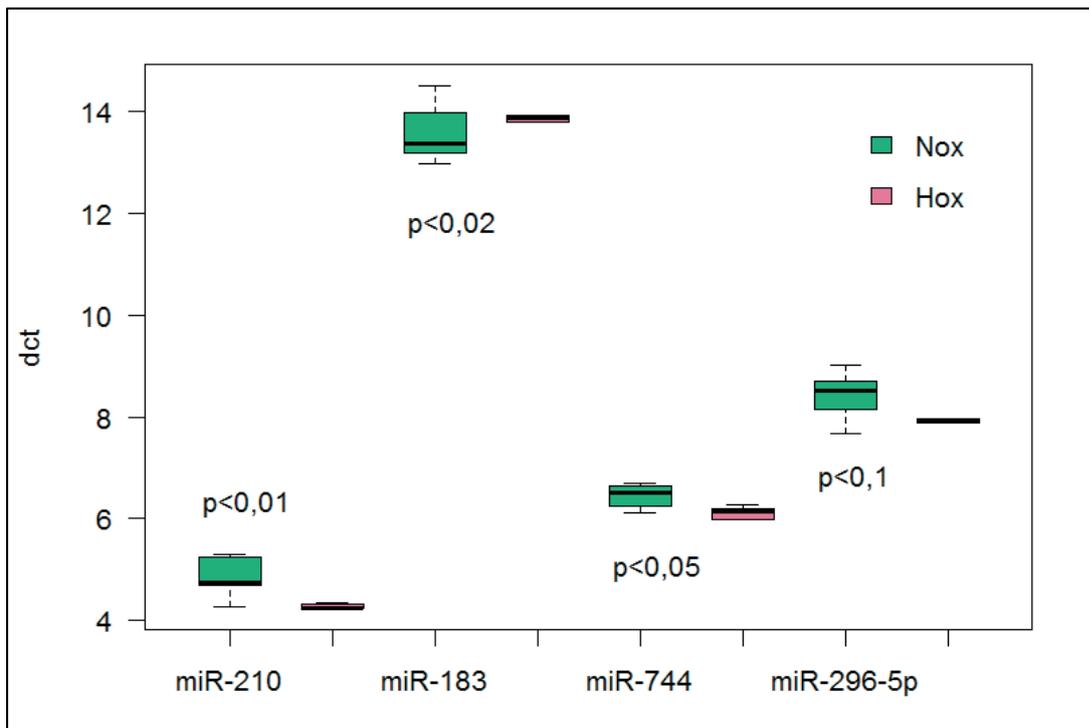


Abbildung 3.19 Real-Time-PCR-Validierung

Ergebnisse

Name	ID	logFC	A	t	p	p _{fd} r
hsa-let-7g	46438	-1,19	8,068	-1,991	0,055	0,705
hsa-miR-573	17641	-0,99	5,618	-2,958	0,005	0,25
hsa-miR-302f	45745	-0,928	6,14	-1,706	0,096	0,859
hsa-miR-92a-1*	42926	0,9	5,379	1,967	0,057	0,712
hsa-miR-489	11121	0,9	5,023	1,802	0,08	0,824
hsa-miR-569	14854	0,89	4,431	2,043	0,048	0,694
hsa-miR-1272	46363	-0,875	7,466	-1,782	0,083	0,826
hsa-miR-1301	46215	-0,865	7,798	-1,384	0,175	0,868
hsa-miR-409-5p	42925	0,854	5,606	2,257	0,03	0,52
hsa-miR-20a*	42663	0,846	4,837	1,882	0,068	0,759

Tabelle 3.3 Top 10 miRNAs nach Regulation (logFC)

Name	ID	logFC	A	t	p	p _{fd} r
hsa-miR-1826	46802	-0,136	15,855	-1,461	0,153	0,859
hsa-miR-1308	46739	-0,098	15,557	-0,623	0,537	0,963
hsa-miR-720	42751	0,24	15,557	1,872	0,069	0,762
hsa-miR-668	42727	-0,041	15,387	-0,3	0,765	0,963
hsa-miR-24-1*	42575	-0,383	15,186	-2,255	0,03	0,520
hsa-miR-923	42554	0,319	14,692	1,578	0,123	0,859
hsa-miR-933	42539	-0,175	14,151	-1,297	0,203	0,876
hsa-miR-939	42529	-0,165	13,801	-1,438	0,159	0,867
hsa-miR-494	42540	0,03	13,731	0,207	0,837	0,963
hsa-miR-149*	42486	0,437	13,607	2,398	0,022	0,491

Tabelle 3.4 Top 10 miRNAs nach Abundanz

Ergebnisse

Name	ID	logFC	A	T	p	p _{fd}
hsa-miR-210	42797	0,8	7,351	6,379	1.91E-07	0,00016
hsa-miR-183	10977	-0.617	8,899	-5,378	4.34E-06	0,0018
hsa-miR-744	27568	0.604	10,219	4,734	3.19E-05	0,0089
hsa-miR-374b*	42476	-0,644	7,873	-3,875	0,00042	0,082
hsa-miR-634	42591	0,303	9,82	3,823	0,00049	0,082
hsa-miR-637	17354	0,373	10,516	3,557	0,001	0,114
hsa-miR-874	42808	0,445	11,55	3,555	0,0011	0,114
hsa-miR-675	42761	0,364	8,915	3,545	0,0011	0,114
hsa-miR-139-3p	42451	0,384	8,891	3,476	0,0013	0,123
hsa-miR-129-5p	42467	0,418	11,238	3,422	0,0015	0,128

Tabelle 3.5 Top 10 miRNAs, sortiert nach korrigiertem p-Wert

3.4 Versuchsreihe Maus-Myokard

3.4.1 Einleitung

Diese Versuchsreihe wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Experimentelle Kardiologie des Franz-Groedel-Instituts an der Kerckhoff Klinik, Bad Nauheim, durchgeführt. Sie stellt innerhalb dieser Arbeit die erste Anwendung der etablierten Methode in einem größeren experimentellen Versuchsaufbau dar. In dieser Arbeit wird der Fokus auf die Messtechnik, Auswertung und weitere Verarbeitung der Messdaten gelegt. Die ursprüngliche experimentelle Fragestellung, mögliche biologische Bedeutung und Einordnung der Ergebnisse sind nicht Teil der vorliegenden Arbeit und sollen nur zur Orientierung thematisiert werden. Daher wurden einzelne Ergebnisse der Versuchsreihe bereits in Kapitel 3.2 thematisiert.

3.4.2 Versuchsaufbau

Das bereits vorgegebene Maus-Myokardinfarkt-Modell beinhaltet drei große Gruppen. Eine Übersicht gibt die Abbildung 3.20. Die Kontrollgruppe beinhaltet unbehandelte Tiere. Sowohl in der Infarkt- als auch in der Reflow-Gruppe wurden chirurgisch durch Unterbrechung von Koronararterien Myokardinfarkte verursacht. Bei den Tieren der Reflow-Gruppe wurde diese Unterbrechung nach 45min komplett aufgelöst. Zwei, fünf und zehn Tage nach Ereignis wurde für die miRNA Microarrays infarziertes Gewebe entnommen und die Gesamt-RNA mit TriZol nach der Castoldi-Methode extrahiert (das erweiterte Waschprotokoll, welches in Kapitel 3.1 beschrieben wird, findet hier noch keine Anwendung). Bis zu diesem Schritt wurde das Experiment in Bad Nauheim

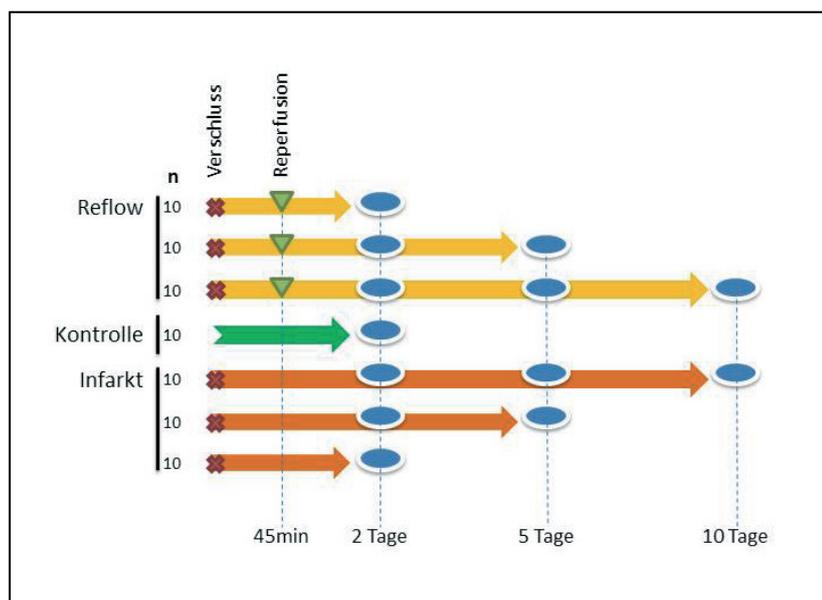


Abbildung 3.20 Übersicht Modell Maus-Myokard

durchgeführt. Die aufgereinigte RNA wurde dann im Rahmen dieser Arbeit weiter verwendet. Die RNA wurde nach dem Castoldi-Protokoll weiter prozessiert, einfarbig mit Cy3 markiert und hybridisiert (miChip V. 9.2).

3.4.3 Microarrays

Die Hybridisierung war in 67 von 70 Fällen erfolgreich, aufgrund schlechter Array- oder RNA-Qualität wurden lediglich 54 von diesen 67 Arrays zur abschließenden Auswertung herangezogen (siehe 3.2.2, sowie Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13).

Mit den Daten wurde eine Quantilen-Normalisierung durchgeführt, der logFC für die einzelnen miRNAs an den gegebenen Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolle berechnet, p-Werte für multiples Testen korrigiert und das Ergebnis im Volcano-Plot grafisch dargestellt (Abbildung 3.21). Sowohl in der Infarkt-, als auch in der Reflow-Gruppe sind zu jedem Zeitpunkt einige miRNA-logFCs mit einer erwarteten Rate an falsch positiven unter 5% dargestellt. Aufgrund der großen Anzahl signifikant regulierter miRNAs sind nur einige exemplarisch namentlich gekennzeichnet. Auf den ersten Blick sichtbar ist, dass sich bei Infarkt und Reflow an gleichen Tagen ein ähnliches Bild bietet und mit steigendem Zeitpunkt jeweils mehr miRNAs reguliert sind. Betrachtet man die Situation bezogen auf den Unterschiede zwischen Infarkt und Reflow am selben Tag (Abbildung 3.22), ist keine miRNA auf korrigiertem Niveau signifikant hoch- oder herunterreguliert. Die zweite rote Linie (entsprechend des korrigierten p_{fdr}) befindet sich somit außerhalb des Bildes.

Zur genaueren Analyse der Regulationen wurde zu diesem Datensatz noch eine Heatmap erstellt (Abbildung 3.23). Zur besseren Übersicht wurden nur miRNAs mit einer Regulation um mindestens den Faktor 2 ($=\log\text{FC}$ von 1) und 5% fdr dargestellt. Das Expressionslevel wird farbcodiert und sich ähnlich verhaltende Gruppen geclustert (sog. *hierarchical clustering*). Hervorzuheben ist z.B. die miR-21, die bei allen Gruppen sehr stark und immer signifikant hochreguliert wird, ebenso die miR-689. Des Weiteren erkennt man, dass die einzelnen Tage sich ähnlicher verhalten als die Gruppen untereinander. Hierbei ist besonders Tag 2 bei Infarkt und Reflow sehr deutlich geclustert, da hier nur einige wenige, dafür aber in beiden Gruppen weitgehend gleiche miRNAs reguliert werden.

Zusammengefasst sind also in beiden Gruppen, verglichen zur Kontrolle mit steigenden Zeitpunkten mehr miRNAs reguliert. Die beiden Gruppen gegeneinander verhalten sich dabei an den jeweiligen Zeitpunkten sehr ähnlich, sodass hier keine signifikante Regulation von miRNAs feststellbar ist.

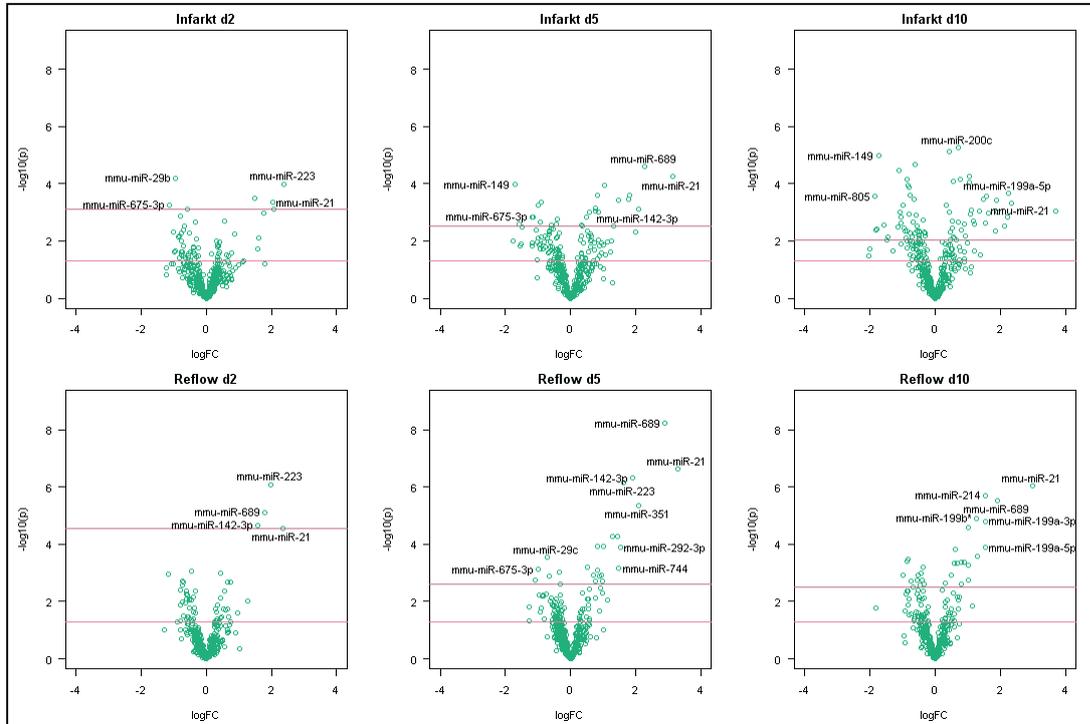


Abbildung 3.21 Volcano-Plots Infarkt und Reflow gegen Kontrolle

Infarkt gegen Kontrolle oben, Reflow gegen Kontrolle unten

Untere rote Linie $p < 0,05$, obere Linie $p_{fdr} < 0,05$

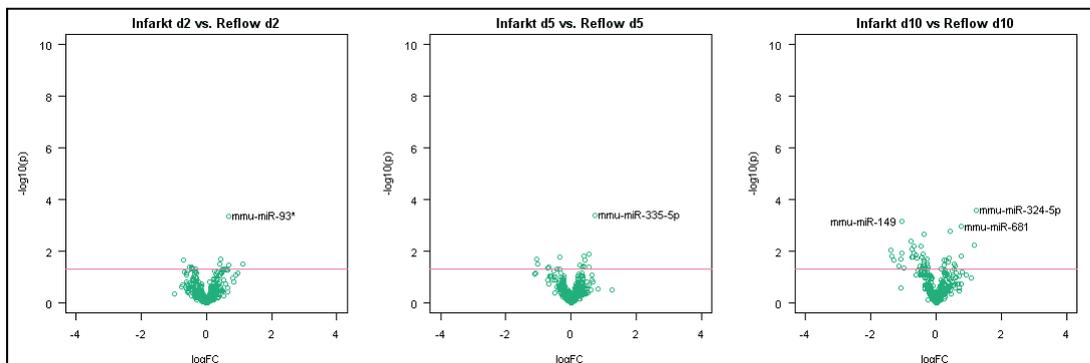


Abbildung 3.22 Volcano-Plots Infarkt gegen Reflow

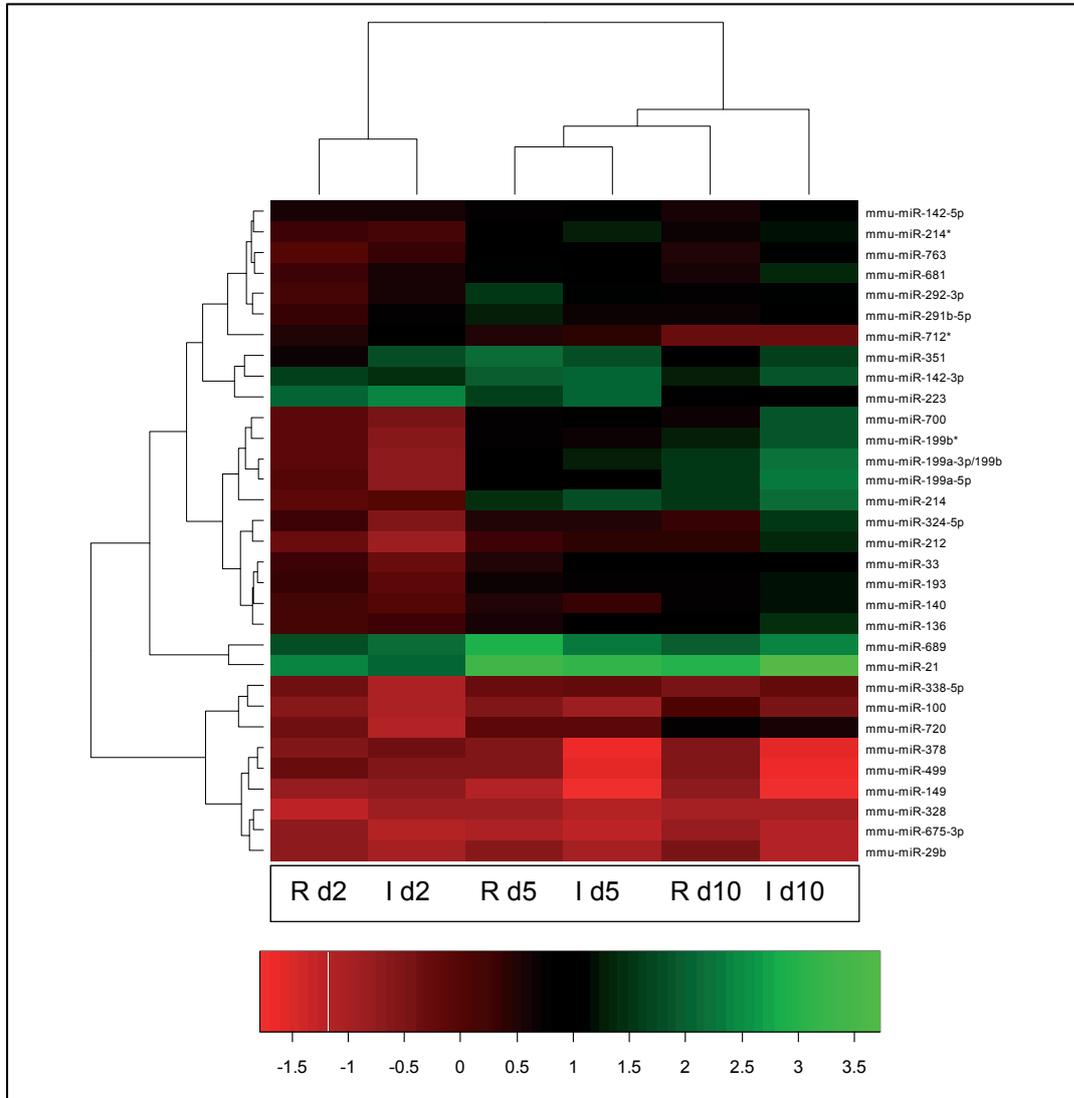


Abbildung 3.23 Heatmap Infarkt / Reflow gegen Kontrolle

(R d2 $\hat{=}$ LFC Reflow Tag 2, I d2 $\hat{=}$ LFC Infarkt Tag 2 usw.)

3.5 miRNA-Zielgen-Analyse / Signalweg-Analyse

Zur weiteren Analyse der miRNA-Zielgene wurde aus den Expressionsprofilen der humanen Lungenfibroblasten unter Normoxie und Hypoxie ein Wichtungsverfahren entwickelt, mit dem Ziel unter Nutzung des gesamten Datensatzes eine tiefergehende Analyse der Zielgene und deren Anreicherung von Genen in Signalwegen durchführen zu können und nicht nur die Informationen ausgewählter miRNAs zu nutzen. Hierzu wurde zunächst für den gesamten Satz der auf dem Mikroarray untersuchten miRNAs nach Zielgenen in Mirtarget2, PicTar, miRanda, TarBase, TargetScan und miRBase gesucht und diese in einer Liste zusammengestellt. Daraufhin wurde die Liste nach Genen gefiltert, die von einer vorgegebenen Mindestanzahl von Algorithmen vorhergesagt wurden. Optional wurden die Algorithmen einem Wichtungsfaktor zugeordnet. Für diese Gene erfolgte eine Berechnung von *Scores* als Akkumulation der t-Werte bzw. der Koeffizienten über alle miRNAs. Davon ausgehend, dass die gesteigerte Expression einer miRNA die Expression des Zielgens supprimiert, wird der *Score* zum Schluss negativiert. Ein höherer (positiverer) *Score* bedeutet somit einen geringeren Einfluss der miRNA auf das entsprechende Gen.

Nun wird anhand der Gene und der *Scores* ein *Gene-Set-Test* durchgeführt und geprüft, ob sich eine Gruppe von vorhergesagten Genen überproportional in Kegg-Signalwegen wiederfindet. Die Grundfunktion *geneSetTest* ist im R Paket *limma* implementiert und entspricht dem Ziel einer *Gene Set Enrichment Analysis* nach Mootha et al.: Es wird die Wahrscheinlichkeit für eine Gruppe von Genen berechnet, differenziell exprimiert zu sein.^{101,107} In diesem Fall erfolgt die Wahrscheinlichkeitsberechnung anhand der *Scores* und der als Gengruppe vorgegebenen Kegg-Signalwege.

Tabelle 3.6. und 3.7 zeigen die nach Koeffizienten und nach t-Wert pertubierten Signalwege (5% fdr) mit den entsprechenden Kegg-Bezeichnungen. Berechnet wurde diese Ergebnis mit einer 10-fachen Wichtung für *tarbase* und mindestens von 3 Suchmaschinen vorhergesagten Genen.

Ergebnisse

Pathway	ID	$P_{t (fdr)}$	$P_{koef (fd)}$
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	05410	<0,01	0,053
Pathways in cancer	05200	<0,01	<0,001
Notch signaling pathway	04330	<0,05	0,66
Axon guidance	04360	<0,05	<0,001
Adipocytokine signaling pathway	04920	<0,05	<0,05
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	05412	<0,05	<0,05
Dilated cardiomyopathy	05414	<0,05	0,18
Melanoma	05218	<0,05	<0,01
Chronic myeloid leukemia	05220	<0,05	<0,05
Peroxisome	04146	<0,05	<0,01
ECM-receptor interaction	04512	<0,05	<0,01
Hematopoietic cell lineage	04640	<0,05	0,15
Glycerophospholipid metabolism	00564	<0,05	0,31
Prostate cancer	05215	<0,05	<0,05

Tabelle 3.6 p-Wert Signalwege berechnet nach t-Wert ($p_{t (fdr)} < 0.05$)

Pathway	ID	$P_{t (fdr)}$	$P_{koef (fdr)}$
Wnt signaling pathway	04310	0,23	<0,001
Axon guidance	04360	<0,05	<0,001
Pathways in cancer	05200	<0,01	<0,001
ECM-receptor interaction	04512	<0,05	<0,01
Adherens junction	04520	0,53	<0,01
Neurotrophin signaling pathway	04722	0,51	<0,01
Melanoma	05218	<0,05	<0,01
Peroxisome	04146	<0,05	<0,01
Endocytosis	04144	0,25	<0,01
Focal adhesion	04510	<0,1	<0,01
Glioma	05214	0,25	<0,01
Regulation of actin cytoskeleton	04810	<0,1	<0,01
Oocyte meiosis	04114	0,33	<0,05
Colorectal cancer	05210	0,68	<0,05
Chronic myeloid leukemia	05220	<0,05	<0,05
Small cell lung cancer	05222	0,25	<0,05
Ubiquitin mediated proteolysis	04120	0,25	<0,05
MAPK signaling pathway	04010	0,17	<0,05
Calcium signaling pathway	04020	0,12	<0,05
Jak-STAT signaling pathway	04630	0,48	<0,05
Long-term potentiation	04720	0,12	<0,05

Ergebnisse

Heparan sulfate biosynthesis	00534	0,67	<0,05
mTOR signaling pathway	04150	0,33	<0,05
Prostate cancer	05215	<0,05	<0,05
Dorso-ventral axis formation	04320	0,12	<0,05
TGF-beta signaling pathway	04350	<0,1	<0,05
Insulin signaling pathway	04910	0,25	<0,05
Adipocytokine signaling pathway	04920	<0,05	<0,05
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	05412	<0,05	<0,05
Melanogenesis	04916	0,48	<0,05
Circadian rhythm - mammal	04710	0,23	<0,05

Tabelle 3.7 p-Wert Signalwege berechnet nach Koeffizient ($p_{\text{koef (fdr)}} < 0,05$)

3.5.1 Integration von mRNA-Microarrays

Zum Vergleich der theoretischen Vorhersage für Signalwege basierend auf vorhergesagten miRNA-Zielgenen (siehe Kap. 0) mit der Signalweganalyse anhand echter Expressionsdaten wurden mit den Normoxie und Hypoxieproben 4x44k mRNA-Microarrays der Firma Agilent durchgeführt. Mit den erhaltenen Expressionsdaten wurde nun anhand der regulierten Gene ebenfalls eine Signalweganalyse durchgeführt und die Signalwege, in denen diese Gene angereichert vorkommen, mit dem Ergebnis aus 0 verglichen. Berechnet nach dem Koeffizienten sind 21 (67,7%) der Signalwege aus den vorhergesagten miRNA-Array-Signalwegen (insgesamt 31 Signalwege) mit den berechneten mRNA-Array Signalwegen (62 ermittelte Signalwege) identisch, berechnet nach dem t-Wert sind es 8/14 (61,2%) miRNA-Signalwegen, die ebenfalls durch die mRNA-Expressionsdaten (insgesamt 59 Signalwege) errechnet werden. Eine Übersicht der Schnittmenge der Signalwege zeigen die Tabelle 3.8 und Tabelle 3.9.

Weiterhin wurde anhand der mRNA-Expressionswerte die Zielgenanalyse mit Vorhersagealgorithmen evaluiert. Die Tabelle 3.10 und Tabelle 3.11 stellen die Anzahl der durch den jeweiligen Algorithmus vorhergesagten Zielgene vor, die im Array eine Regulierung zeigen. Dabei werden nur Gene berücksichtigt, die eine Mindestintensität von 6,5 haben und in die richtige Richtung reguliert sind (Zielgene mir-210 und -744↓, Zielgene miR-183↑). Betrachtet man diese Analyse nach der *false discovery rate* (fdr, Tabelle 3.10) zeigen die Algorithmen *Pictar* und *Targetscan* die höchsten Anteile tatsächlich regulierter Zielgene (20,83% bzw. 21,65% bei fdr=0,2), ebenso nach Koeffizient (6,77% bzw. 5,19%). Dabei sind bei einer fdr von 0,2 ca. 18% und bei einem Betrag des Koeffizienten von mindestens 0,5 ca. 17% der tatsächlich regulierten Gene allein durch die Zielgenvorhersage der o.g. miRNAs erfasst worden. Inhaltliche Schnittmengen der Algorithmen sind in den Abbildung 3.25 (Gene mit mittlerer Expression >6,5) Abbildung 3.24 (mittlere Expression >6,5 und fdr < 0,2) als Mengendiagramm (*Venn*-Diagramm) dargestellt. Das einzige von allen Algorithmen vorhergesagte und im Array regulierte Gen ist die mitochondriale Isocitrat-Dehydrogenase 2 (IDH2). Von jeweils vier Algorithmen vorhergesagt werden die Protein-Phosphatase 2 (PPP2R5C) und die Peptidylglycin-alpha-amidierende Monooxygenase (PAM).

Die anderen zahlreichen regulierten Einzelgene werden im Falle einer wichtigen Bedeutung für die Diskussion ebenda mit Regulationswerten aufgeführt.

Ergebnisse

Pathway	ID	p_{koef} (fdr)
Focal Adhesion	04510	<0,001
Regulation of actin cytoskeleton	04810	<0,001
Pathways in Cancer	05200	<0,001
Endocytosis	04144	<0,001
Prostate cancer	05215	<0,001
Colorectal cancer	05210	<0,001
Adherens junction	04520	<0,001
Melanoma	05218	<0,001
Glioma	05214	<0,001
Axon guidance	04360	<0,001
Oocyte meiosis	04114	<0,001
Wnt signaling pathway	04310	<0,001
Insulin signaling pathway	04910	<0,001
mTOR signaling pathway	04150	<0,01
Chronic myeloid leukemia	05220	<0,01
TGF-beta signaling pathway	04350	<0,01
Neurotrophin signaling pathway	04722	<0,01
Long-term potentiation	04720	<0,01
ECM-receptor interaction	04512	0,05
Circadian rhythm – mammal	04710	0,05

Tabelle 3.8 Schnittmenge Signalwege nach Koeffizient

Pathway	ID	p_t (fdr)
Pathways in cancer	05200	<0,001
Prostate cancer	05215	<0,001
Melanoma	05218	<0,001
Axon Guidance	04360	<0,001
Notch signaling pathway	04330	<0,01
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	05410	<0,01
Dilated cardiomyopathy	05414	<0,01
Chronic myeloid leukemia	05220	<0,05

Tabelle 3.9 Schnittmenge Signalwege nach t

Ergebnisse

Algorithmus	n(Gene*)	n(Gene** fdr<0,1)	%	n(Gene** fdr<0,2)	%
Miranda	1458	141	9,67%	204	13,99%
Mirtarget2	199	21	10,55%	34	17,09%
Pictar	192	28	14,58%	40	20,83%
Mirbase	1240	94	7,58%	149	12,02%
Targetscan	231	37	16,02%	50	21,65%
Gesamt	3320	321	9,67%	477	14,37%
Gene im Array***		3818	8,41%	6176	

Tabelle 3.10 Im mRNA-Array signifikant-regulierte Zielgene nach fdr

*nur Zielgene von miR-210 -744 und -183 mit mittlerer Expression >6.5, **zusätzlich Betrag des Koeffizienten >0.5 und Regulation in die der miRNA entsprechende Richtung, *** im mRNA-Array regulierte Gene mit der Spalte entsprechender fdr

Algorithmus	n(Gene*)	n(Gene** coef >1)	%	n(gene** coef >0.5)	%
Miranda	1458	5	0,34%	13	0,89%
Mirtarget2	199	0	<0,1%	5	2,51%
Pictar	192	0	<0,1%	13	6,77%
Mirbase	1240	15	1,21%	33	2,66%
Targetscan	231	0	<0,1%	12	5,19%
Gesamt	3320	20	0,60%	76	2,29%
Gene im Array***		223	8,97%	1108	6,86%

Tabelle 3.11 Im mRNA-Array signifikant-regulierte Zielgene nach Koeffizient

*nur Zielgene von miR-210 -744 und -183 mit mittlerer Expression >6.5, ** Regulation in die der miRNA entsprechende Richtung, *** im mRNA-Array regulierte Gene mit der Spalte entsprechendem Koeffizienten (coef)

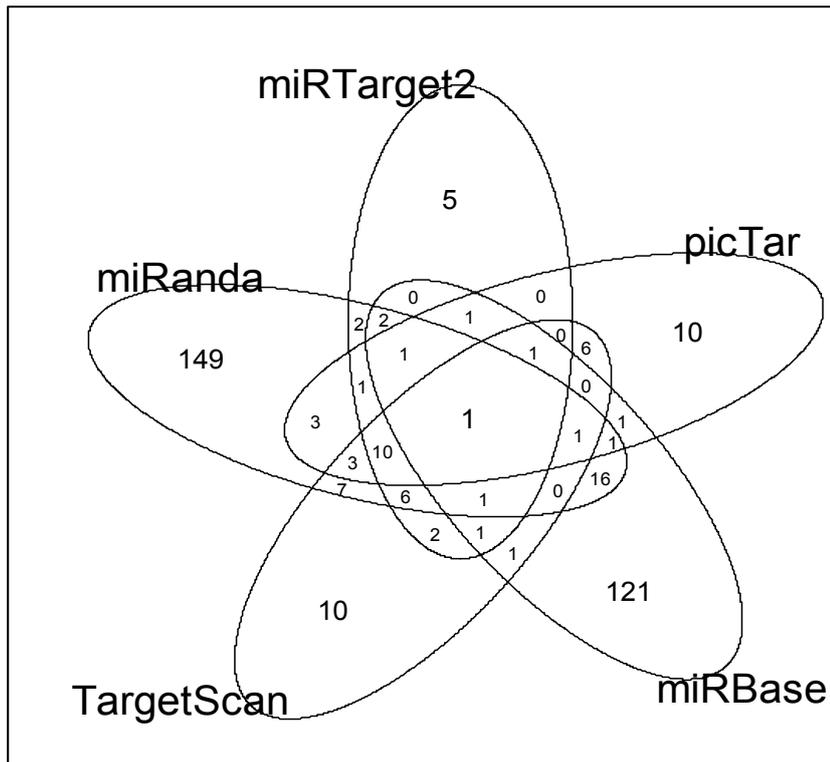


Abbildung 3.24 Schnittmengen regulierter Zielgene mit 20% fdr

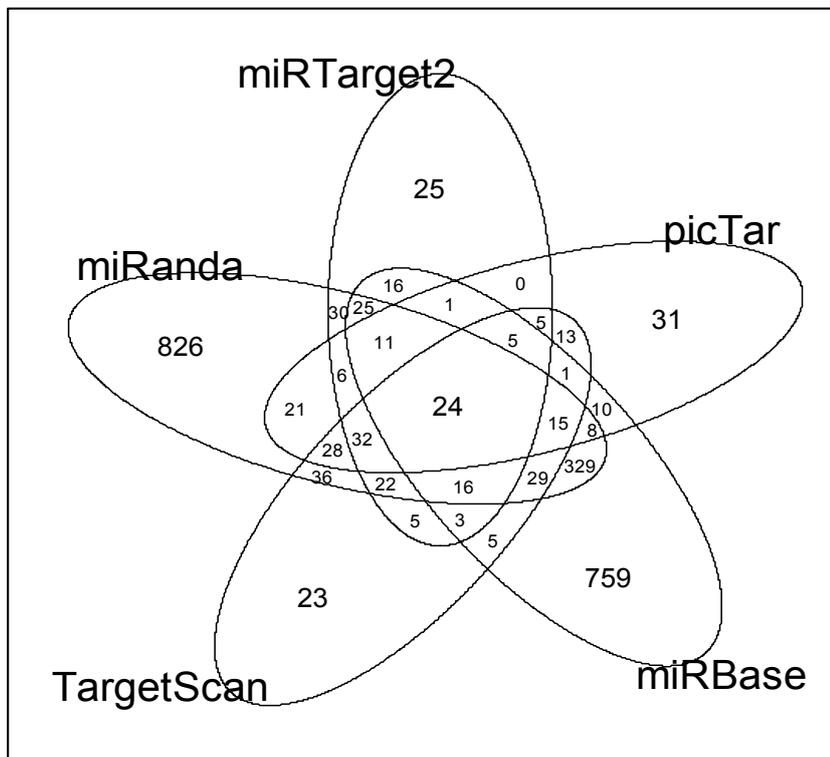


Abbildung 3.25 Schnittmengen der Zielgene gesamt

4 Diskussion

4.1 Etablierung der Methode

4.1.1 Probenaufreinigung und Labelling

Die Probenaufreinigung ist eine wichtige Grundlage jedes Microarray-Experimentes. Neben den grundlegenden Anforderungen an guter Qualität und Quantität ist eine praktikable Durchführung im Laboralltag dabei von großem Vorteil. Im Vergleich von Säulenaufreinigung und Phenol-basierter Aufreinigung ist das Verfahren mit Säule schneller durchführbar (keine Präzipitation bei -80°C notwendig) und sicherer (Säule hält RNA sicher zurück, präzipitiertes Pellet gelegentlich verlustgefährdet).

In einem systematischen Vergleich von sechs miRNA-Extraktionsmethoden bei dem Ektoparasiten *Gyrodactylus salaris*, beobachten die Autoren deutliche Unterschiede in Qualität (RIN) und Quantität der RNA.¹⁰⁸ Im eigenen orientierenden Vergleich von Säulenaufreinigung mit Präzipitation kann diese Beobachtung nicht bestätigt werden, da bei beiden Extraktionen vergleichbare Werte von RIN und RNA-Konzentration ermittelt wurden. Ohnehin sind bei Versuchsaufbauten basierend auf der in dieser Arbeit durchgeführten Zellkultur quantitative Schwankungen nicht von Bedeutung, da in der Regel ausreichend Ausgangsmaterial vorhanden ist. Die erhaltene Fraktion an miRNAs war in den exemplarisch hierauf untersuchten Proben ebenfalls im Erwartungsbereich (siehe Kap. 3.1.2).

Auch qualitative Aspekte der Gesamt-RNA scheinen bei der Messung von miRNAs keine wesentliche Rolle zu spielen. So beobachten verschiedene Autoren eine stabile miRNA-Messung in Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten (FFPE) Präparaten verschiedenen Alters verglichen mit frisch gefrorenen Präparaten¹⁰⁹ sowie Expressionsabweichungen innerhalb der zu erwartenden Varianz durch experimentelle Degradation bis zu einer RIN von 3.¹¹⁰ Daher scheinen die ursprünglich für mRNA-Microarrays entwickelten Qualitätskriterien bei miRNA-Microarrays nur eingeschränkt von Bedeutung zu sein, da aufgrund der Kürze von 20-22 Nukleotiden die Degradation zunächst vornehmlich die mRNA-Fraktion betrifft.¹¹⁰ Da jedoch auch gegenteilige Berichte über die miRNA-Stabilität vorhanden sind¹¹¹ bleibt die Sachlage diesbezüglich ambivalent. Besonders wichtig ist diese Thematik insbesondere für Experimente mit klinischen Proben wie z.B. Blutplasma, da deren Aussagekraft nur in Zusammenhang mit der miRNA-Stabilität im Organismus betrachtet werden kann. Auch hier gibt es bereits Evidenz, dass miRNAs verhältnismäßig stabil sind und im Blut zirkulierende miR-

Diskussion

NAs als Biomarker geeignet sind.¹¹² Bezogen auf die in dieser Arbeit verwendeten Proben, war die Qualität der Extraktion mit Fällung in jedem Fall sehr gut (RIN >8).

Wesentlich für die Auswahl der RNA-Extraktion mit Fällung nach Castoldi et al.⁸⁶ als Extraktionsmethode für die in dieser Arbeit durchgeführten miRNA-Microarray war daher der beobachtete selektive Verlust von miRNAs in der Säulenaufreinigung (Abbildung 3.3 und Abbildung 3.2). Im durchgeführten Umfang können diese Ergebnisse keinen systematischen Zusammenhang nachweisen. Da jedoch Qualität und Quantität der RNA beider Extraktionsmethoden ähnlich sind und die Fällung nur kleinere methodische Nachteile mit sich bringt wurde diese in dieser Arbeit bevorzugt. Zudem decken sich die Beobachtungen mit denen anderer Arbeitsgruppen,^{106,111} weswegen die Extraktion mit TRIzol o.ä. weiterhin als Methode der Wahl zur miRNA-Extraktion anzusehen ist.¹¹¹

Die beobachteten Schwankungen der photometrischen (anhand der Nanodrop-Kriterien) und damit chemischen Reinheit der Probe sind als klarer Nachteil der Fällung zu werten, deren Kompensation durch das intensivierete Waschprotokoll hat sich als adäquates Mittel erwiesen. Der dadurch erlittene Verlust an RNA-Material (mittlerer Verlust $36,12\% \pm 19,1\%$) ist deutlich messbar, jedoch bei ausreichend Ausgangsmaterial zu verkraften. Probleme mit der Labelling-Effizienz bis hin zu nicht verwertbaren Ergebnissen (siehe Kapitel 3.1.2) machen diesen Schritt jedoch bei kleinen Versuchsreihen unabdingbar, da hier eine hohe Microarray-Ausfallquote sehr viel schwerer wiegen würde. Bei einer wie in Kapitel 3.4 gezeigten Versuchsreihe mit vielen Microarrays führt selbst eine Ausfallquote von 23% (16/70) über alle Gruppen zu aussagekräftigen Ergebnissen. Eine direkte Korrelation zwischen Labelling-Effizienz und Nanodrop-Messwerten bei 230nm Wellenlänge konnte nicht ermittelt werden, auch wenn die Messwerte bei 230nm nach dem erneuten Waschen durchgehend kleiner wurden. Hinweise, dass diese Problematik bei der Verwendung von TRIzol weniger ausgeprägt ist als bei der Verwendung von QIAzol, konnten in kleinen Versuchsreihen nicht gestützt werden. Die potentielle Interferenz von TRIzol-Rückständen mit späteren enzymatischen Reaktionen ist zwar bekannt¹¹¹, das Problem wird allerdings in der Literatur nicht so massiv beschrieben, wie in dieser Arbeit systematisch nachgewiesen werden konnte (siehe auch Abbildung 3.5 Intensitätsverteilungen abhängig von erneutem Waschen). Andere Ursachen für die hohe Variabilität der Labelling-Effizienz können als unwahrscheinlich angesehen werden, da die Qualität der Probe vorher streng determiniert wurde (RIN>8) und der miRNA-Gehalt der Proben dem Erwartungswert entsprach (siehe Kap. 3.1.2). Auch weitere mögliche Ursachen wie z.B. Verunreinigungen anderer Reaktionskomponenten mit Nukleasen oder fehlende Aktivität der Enzyme konnten durch Substitutionsversuche schrittweise ausgeschlossen wer-

den. Der deutlich sichtbare Erfolg des rigorosen Waschprotokolls stützt außerdem die These der Probenverunreinigung durch Reste des Lysepuffers und lässt vermuten, dass diese so systematisch rausgewaschen werden konnten. Insgesamt bleibt die Durchführung eines rigorosen Waschprotokolls wie dem Gezeigten für die einzelne Versuchsreihe sorgfältig abzuwägen.

Der durchgeführte Vergleich zwischen dem Exiqon miRCURY™-Labelling-Protokoll und dem Labelling mittels T4-Ligase nach Castoldi et al.⁸⁶ zeigte eine deutliche Überlegenheit des Castoldi-Protokolls mit etwa doppelt so hohen mittleren Vordergrundintensitäten und damit besserem Signal-Rausch-Verhältnis (Abbildung 3.4). Ausgehend davon, dass dem Exiqon-Protokoll wahrscheinlich ein zumindest ähnliches molekularbiologisches Prinzip zugrunde liegt, gibt es zumindest zwei plausible Erklärungsansätze für diese Beobachtung:

1. Inkubationszeit: Die Inkubationszeit im Exiqon-Protokoll ist mit lediglich einer Stunde Labelling-Reaktion sehr kurz gehalten, im Protokoll nach Castoldi ist eine Reaktionsdauer von 10-20h vorgesehen (über Nacht).

2. Konzentrationen: Im Castoldi-Protokoll werden alle Reagenzien deutlich im Überschuss hinzugegeben, beim Exiqon-Protokoll darf dies zumindest angezweifelt werden. Die genaue Zusammensetzung der Reagenzien im Exiqon-Protokoll ist allerdings unbekannt. Dieser Erklärung entsprechend, scheint das Exiqon-Protokoll bei Verdopplung der Volumina der Reagenzien pro Reaktionsansatz deutlich besser zu funktionieren.¹⁰⁶

Die zweifarbige Hybridisierung mit Cy3- und Cy5-markierter RNA wird von Castoldi et al. aufgrund der bekannten Stabilitätsprobleme mit Cy5 nicht empfohlen⁸⁶. Durch die Anwendung des von Agilent entwickelten Stabilisierungsschrittes mit Stabilisierungslösung und Acetonitril konnte jedoch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass stabile Cy5-Signale mit geringem Mehraufwand zu erreichen sind. Die Beobachtung, dass die gewählte Farbe jedoch einen spezifischen Einfluss auf das experimentelle Ergebnis hat (Abbildung 3.6) gibt allerdings die klare Richtlinie vor, einfarbige Hybridisierungen ausschließlich mit Cy3-markierter RNA durchzuführen. Einfarbige Hybridisierungen mit Cy5 wären prinzipiell auch möglich, die Mehrkosten und der Mehraufwand im Gegensatz zu Cy3 jedoch nicht begründbar. Auch Risso et al.¹¹³ beschreiben einen Farbefekt bei miRNA Microarrays und kommen zu dem Ergebnis, dass sich die systematischen Effekte durch einen Farbstofftausch (*dye swap*) nach Dabney et al.¹¹⁴ aus dem Ergebnis eliminieren lassen. Durch dieses Verfahren können falsch-Positive vermieden werden, es erhöht sich jedoch die Varianz und damit die Rate falsch-negativer Werte.

Zusammenfassend betrachtet kann anhand der gezeigten Ergebnisse eine Phenol-/Guanidin-basierte RNA-Extraktion in Kombination mit einem T4-Ligase basierendem Labelling als Standard für die Vorbereitung einer miRNA-Microarray-Hybridisierung emp-

fohlen werden. Bei einer kosteneffizienten und schnell zu prozessierenden Plattform wie dem miChip bietet es sich an einfarbig mit Cy3-markierter RNA zu hybridisieren, um so die Probleme mit dem Farbeffekt zu umgehen. Sollten dennoch zweifarbige Hybridisierungen durchgeführt werden wollen, ist ein *dye-swap* Verfahren zur Reduzierung des Farbeffektes unabdingbar. In kleinen Versuchsreihen sollte bei niedrigen 230/260nm-Quotienten im Nanodrop unbedingt ein intensiviertes Waschprotokoll entsprechend dem Gezeigten angewendet werden. Eine teilweise degradierte Gesamt-RNA mit RIN-Werten <8 ist dagegen nicht als Kontraindikation für eine Hybridisierung zu werten, sollte aber zumindest bei RNA-Extraktionen aus Zellkulturen überdacht werden, da solche Werte bei optimaler Durchführung nicht auftreten sollten. Insgesamt scheinen für mRNA-Microarrays entwickelte Qualitätskriterien für miRNA-Microarrays nur bedingt anwendbar zu sein, da sie weder Verunreinigungen durch Lysepuffer erfassen, noch anhand der RIN die Sinnhaftigkeit einer Hybridisierung auf dem Microarray abgeleitet werden kann.

4.1.2 Microarrays

Zur Etablierung der Microarray-Plattform wurden zunächst die Produkte der Firmen Miltenyi (miRXPlore™) und Exiqon (miRCURY LNA™) miteinander verglichen. Auf beiden Microarrays wurden self-self-Hybridisierungen derselben Probe durchgeführt, welche beide vorher mit dem Exiqon-Labeling-Protokoll zweifarbig markiert wurden. Die Tatsache, dass das Miltenyi-Microarray sowohl höhere Werte für den Hintergrund als auch kleinere für den Vordergrund aufweist, unterstreicht deutlich die Überlegenheit des Exiqon-Microarrays. Höhere Vordergrundwerte können dabei schlüssig durch die Verwendung der LNA-Technologie (siehe auch Kapitel 2.7.1.2) und der daraus resultierenden Schmelzpunktnormalisierung der Fänger-moleküle begründet werden.^{44,86,95-97} Halb so hohe mittlere Hintergrundintensitäten (Differenz $>\log_2(2)$, siehe Kapitel 3.1.3) liegen wahrscheinlich in der besseren Beschichtung des Exiqon-Microarrays begründet, da hier die Farbstoffresiduen schlechter binden. Ein weiteres Manko der Miltenyi-Microarrays in dieser Arbeit ist die fehlende Kompatibilität für Agilent-Hybridisierungskammern, da diese als Eigenschaft der zu etablierenden miRNA-Microarray-Plattform in den Zielen dieser Arbeit definiert wurde.

Der weitere Einschluss des miChip-Microarrays in den Vergleich verschiedener Microarrays kann nicht als systematisch angesehen werden. Die Verwendung des mi-Chips als Basis für weitere Experimente kann jedoch unabhängig davon begründet werden. So verwendet die Plattform Sonden der Firma Exiqon, weswegen deren o.g. Vorteile bezüglich der Vordergrundintensitäten auch auf die miChip-Plattform zutreffen. Die höheren Hintergrundwerte im Vergleich zu Exiqon liegen wiederum in der Be-

schichtung begründet, werden jedoch durch die stabil hohen Vordergrundintensitäten, die Effizienz des Labellings nach Castoldi und einem deutlichen Kostenvorteil kompensiert.

4.1.3 Hintergrundkorrektur, Normalisierung und Teststatistik

Ein Microarray ist ein vielschrittiges Experiment, welches in jedem Experiment in der Regel eine große Anzahl Messwerte produziert. Daher ist eine übersichtliche und schnelle Verarbeitung der Daten erforderlich, welche die technische Varianz zuverlässig minimiert. Diese Anforderungen können durch die Entwicklung eines standardisierten Auswertungsalgorithmus schnell und reproduzierbar erreicht werden. In dieser Arbeit wurde ein solcher Algorithmus durch den systematischen Vergleich verschiedener Auswertungsmethoden entwickelt. Die Betrachtung an dieser Stelle bezieht sich, analog zum Ergebnisteil, ausschließlich auf miRNA-Microarrays. Diese unterscheiden sich zwar wesentlich von mRNA-Microarrays (deutlich weniger Messwerte, andere Prozessierung), die Methoden zur Auswertung sind jedoch für mRNA-Arrays entwickelt worden und sollen hier hinsichtlich der Anwendbarkeit für die Auswertung von miRNA-Microarrays untersucht werden.

Der erste Schritt in der Auswertung ist die Korrektur des Vordergrundes um den Hintergrund. Die in Kapitel 3.2.1 präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die Wahl der Methode hierfür in Bezug auf den Standardfehler über das gesamte Microarray keinen signifikanten Effekt hat. Auch andere Autoren kommen hier zu keinem klaren Ergebnis und empfehlen teilweise sogar das Auslassen der Hintergrundkorrektur aufgrund von Hinweisen, dass diese Vorgehensweise präzisere Ergebnisse für die miRNA-Expression liefern könnte.¹¹⁵ Aufgrund des verhältnismäßig hohen Hintergrundes des miChips im Vergleich zu industriell gefertigten Plattformen wie z.B. von der Firma Exiqon wurde in dieser Arbeit durchgehend eine Hintergrundkorrektur durchgeführt. Die Verwendung der Methode *normexp* aus *limma* bietet hierbei zu anderen Methoden den Vorteil, dass keine negativen Werte produziert werden und damit keine Informationen aussortiert werden (Logarithmus zur Basis 2 ist für negative Zahlenwerte nicht definiert).¹¹⁶

Die Normalisierung der Daten eines Microarrays ist eine wichtige Methode, um systematische Variationen eines Datensatzes herauszurechnen. Wie in Kapitel 3.2.2 gezeigt hat die Wahl der Normalisierung einen deutlichen Effekt auf das Ergebnis. So wird ohne Normalisierung im Versuch mit Pulmonalarterienfibroblasten keine miRNA als reguliert identifiziert (siehe auch Abbildung 3.11), im Versuch Maus-Myokard ist die Regulation stark positiv gewichtet. Durch eine Normalisierung wird die Regulation im Versuch Maus-Myokard deutliche gleichmäßiger verteilt. Von den bei den Pulmonalar-

terienfibroblasten angewendeten Normalisierungsmethoden errechnen die Methoden *loess*, *vsn* und die Quantilnormalisierung im kleineren Datensatz jeweils drei signifikant regulierte miRNAs, wobei nach *loess* in dem vorliegendem Datensatz offenbar eine erhöhte Wichtung von vermehrt exprimierten miRNAs stattfindet und diese auch nur knapp unter einer *fdr* von 0,05 liegen. Die Methode *scale* liefert bezogen auf die Teststatistik mit nur einer signifikant regulierten miRNA die schlechteste Ausbeute. Auch andere Autoren beschreiben die *scale*-Normalisierung zwar als Verbesserung zu keiner Normalisierung, jedoch ebenfalls als unterlegen im Vergleich zu *vsn*- und Quantilnormalisierung¹¹⁷, welche auch in diesem Datensatz die besten Ergebnisse liefern. Ein klarer Überlegenheitsnachweis für eine der beiden Methoden gelingt hier nicht, die *vsn*-Normalisierung scheint jedoch bei einer besonders großen Anzahl differenziell exprimierten miRNAs geringfügige Nachteile zu haben.¹¹⁷ Eine Evaluation zwischen *vsn*- und Quantilnormalisierung kann dementsprechend für jeden Datensatz eine lohnenswerte und mit geringem Aufwand verbundene durchzuführende Betrachtung sein. Die zusätzliche Anwendung des moderiertem t-Tests an Stelle des konventionellen t-Tests verbessert in den Maus-miRNA-Microarrays (siehe Kapitel 3.4.3) nochmals die Teststatistik und kann daher deckend mit der Literatur¹⁰¹ unbedingt für die Auswertung empfohlen werden. Durch die Berechnung einer gewichteten mittleren Varianz (siehe Kap. 2.8.1) aus den Einzelvarianzen können die Informationen anderer Gene für das einzelne Gen mitgenutzt und die Überschätzung des t-Wertes durch Unterschätzung der Varianz minimiert werden.¹⁰¹

Wie bereits durch die Verbesserung der Korrelationskoeffizienten zu vermuten, zeigt sich der Anstieg der regulierten miRNAs unter der ausschließlichen Auswertung von Microarrays guter Qualität signifikant. Daher ist es grundsätzlich zu empfehlen, Microarrays mit im Vergleich zum Gruppenmittelwert deutlich geringeren Korrelationskoeffizienten auszusortieren, da so die biologische Trennschärfe deutlich erhöht wird. Dieses Verfahren profitiert auch von einer ausreichend groß gewählten Gruppengröße, die die aus der Auswertung herausgenommenen Proben kompensieren kann. Allgemeine Richtlinien, wann ein Microarray aus der Auswertung einer Gruppe herausgenommen werden sollte können aus dem vorliegenden Datensatz nicht generiert werden, da jeweils nur Einzelne innerhalb der Gruppe größere Abweichungen in der Korrelation zeigen. Prinzipiell ist die Elimination von Ausreißern zwar kritisch zu sehen, bei einem komplexen experimentellen Versuchsablauf wie bei einem Microarray ist jedoch die Anzahl potentieller technischer Störfaktoren entsprechend hoch. Die gute Korrelation der übrigen Proben kann zudem als Indiz für eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auf Basis des miChip-Verfahrens gewertet werden. Auf Basis dieser guten

Reproduzierbarkeit könnten mit zukünftig steigender Anzahl von Versuchsreihen definierte Qualitätskriterien entwickelt werden.

4.2 Versuchsreihe Pulmonalarterienfibroblasten

Das Ziel dieser Versuchsreihe war die Identifizierung von hypoxieregulierten miRNAs in humanen Pulmonalarterienfibroblasten, die über einen Zeitraum von 24h unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden (pO_2 von 0,5%). Die vorangehende Messung der Induktion der HIF-1 α -abhängigen Phosphoglyceratkinase 1 (PGK1) ist eine nützliche Absicherung, um den Erfolg der hypoxischen Stimulation auf zellulärer Ebene messen.¹¹⁸ Dieser Nachweis gelingt deutlich (siehe Kapitel 3.3).

Die Hybridisierung auf dem Microarray identifiziert nach der VSN-Normalisierung und einer fdr von 5% miR-183, -210 und -744 als reguliert, nach der Loess-Auswertung wird zusätzlich miR-296-5p ermittelt. In der qRT-PCR-Validierung sind miR-183, -210 und -744 auf dem 5%-Niveau signifikant reguliert, miR-296-5p auf dem 10%-Niveau. Hiervon wird lediglich miR-183 vermindert exprimiert, der Rest induziert. Ein ähnliches Verhältnis diesbezüglich ließ sich bereits im Rahmen des Maus-Infarktmodells beobachten, wo insgesamt auch die Induktion von miRNAs überwiegt und die Repression auch von den Extremwerten der Regulation her betrachtet deutlich geringer ausfällt. Eine mögliche Ursache dieser Beobachtung liegt vermutlich in der Rolle der miRNAs in zellulären Prozessen begründet: miRNAs, die für die Homöostase der Zelle notwendig sind werden unter zellulärem Stress nur geringfügig oder gar nicht supprimiert und deren Zielgene ggf. vermehrt synthetisiert. Wesentlich für die miRNA-Antwort auf Stress sind jedoch miRNAs, die sonst nur gering exprimiert sind und dann dementsprechend deutlich gesteigert synthetisiert werden.¹¹⁹

Wie im vorangehenden Versuch bezogen auf miR-21, kann in diesem Experiment die Regulation von miR-210 als Indiz für die Validität gewertet werden, da diese eine bekannte Komponente der zellulären Antwort auf Hypoxie sowohl bei gesunden Zellen als auch bei Tumorzellen ist.¹²⁰ Induziert wird miR-210 von dem *hypoxia-inducible-factor-1 α* (HIF-1 α)¹²¹, HIF-2 α ¹²² und NF κ B.¹²³ Davon ausgehend werden grundlegende zelluläre Mechanismen beeinflusst:

1. Die Repression von DNA-Reparatur via RAD52 (unterstützt DNA-Reparatur)¹²⁴
2. Die Umstellung des mitochondrialen Metabolismus von oxidativer Phosphorylierung auf Glykolyse über die Blockierung des *iron-sulfur cluster assembly homologue 1 / 2* (ISCU1 und -2, beteiligt an den Atmungskettenkomplexen I-III; diskutiert wird eine Steigerung der Produktion von *reactive oxygen species* (ROS))

Diskussion

über diesen Mechanismus)¹²⁵, der *succinate dehydrogenase subunit* (SDHD)¹²⁶ und des *cytochrome c oxidase assembly protein 10* (COX10)¹²⁷

3. Steigerung der Angiogenese über die Blockade des antiangiogenetischen Ephrin-A3 (EFNA3)¹²⁸ und dem negativen *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-Regulator *protein tyrosine phosphatase 1b* (PTP1B)¹²⁹
4. Antiapoptotische Effekte über die Antagonisierung des proapoptotischen *caspase-8-associated protein 2* (CASP8AP2)¹³⁰
5. Beteiligung in der Differenzierung von Osteoblasten über den *activin receptor type 1* (ACVR1B)¹³¹ und in der Adipogenese über den Wnt-Signalweg (*transcription factor 7-like 2/ TCF7L2*)¹³²
6. Inhibierung der Zellproliferation über den *E2 transcription factor 2*(E2F3)¹³³⁻¹³⁵, den *fibroblast growth factor receptor like 1* (FGFRL1)¹³⁶, und die *homebox A1* (HOXA1)¹³⁷

In welchem Ausmaß der jeweilige zelluläre Prozess in welcher Zelle beeinflusst wird ist jedoch nicht hinreichend geklärt, da die o.g. Zusammenhänge an unterschiedlichen Zelltypen analysiert wurden. Ein zentraler Einfluss von miR-210 bei verschiedenen Tumoren kann jedoch als sicher angenommen werden, da bereits in Gliomen, Kopf-Hals-Karzinomen, kleinzelligen Tumoren und Adenokarzinomen der Lunge, malignen Melanomen und duktalem Pankreastumoren eine starke Überexpression von miR-210 dokumentiert wurde.¹³⁸ Bei einigen dieser Tumoren finden sich sogar dazu korrespondierende erhöhte Plasmaspiegel von miR-210, teilweise sind Zusammenhänge zur Prognose des Patienten gefunden worden.¹³⁸ Aufgrund der Regulation über HIF dürfte miR-210 jedoch auch in anderen Erkrankungen, welche mit Hypoxie assoziiert sind, eine Rolle spielen. Im Tiermodell konnten bereits eine erhöhte Expression im Rahmen von Herzinsuffizienz und -hypertrophie, transitorisch-ischämischen Attacken des Gehirns und ischämischen Wunden und Extremitäten nachgewiesen werden.¹²⁰ Beim Menschen findet sich eine Induktion von miR-210 beim akuten Myokardinfarkt, obliterierender Artherosklerose und Präeklampsie.¹²⁰ Ein direkter Zusammenhang von miR-210 mit der PAH konnte bisher nicht nachgewiesen werden, die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse machen eine Involvierung dieser miRNA in der Pathogenese jedoch wahrscheinlich, zumal pulmonal-arterielles Remodelling und Fibroblastenaktivierung genauso wie miR-210 maßgeblich von HIF-1 α und -2 α abhängig sind.¹³⁹ Konkret könnte miR-210 z.B. an der Produktion von ROS über ISCU1/2 in den Mitochondrien beteiligt sein oder über die Blockade von PTP1B die VEGF-abhängige Angiogenese der adventitiellen Vasa vasorum¹⁴⁰ fördern. PTP1B-abhängig wird außerdem der für die Pathogenese der PAH sehr wichtige *platelet derived growth factor β* (β PDGFR) ver-

mindert dephosphoryliert und ist damit vermehrt aktiv. Über diesen Mechanismus werden dann Proliferation und Chemotaxis von SMCs der Pulmonalarterie gefördert.¹⁴¹ Vorgehend auf die in 3.5.1 ermittelten Daten zeigt sich tatsächlich eine diskrete Reduktion der Zielgene ISCU (95%-KI -0,14...-0,49) und PTB1B (95%-KI -0,05...-0,35) in den mRNA-Microarrays, was die Verbindung von miR-210 zu Angiogenese und mitochondrialem Metabolismus unter Hypoxie in Fibroblasten der Pulmonalarterie bestärkt. Auch die validierten Zielgene (Tarbase V.6.0⁵³) ATPase Typ 11C (95%-KI -0,12...-0,46) und E2F3 (95%-KI -0,16...-0,66) sind auf dem 10%-Niveau signifikant reguliert und bestätigen die Rolle von miR-210 in Zelldifferenzierung (ATP11C) und Zellzyklusarrest (E2F3). Das ebenfalls regulierte und validierte Zielgen Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase 1 (DDAH1, 95%-KI -0,14...-0,63) wurde bereits mehrfach in Zusammenhang mit der PAH beschrieben. So haben Patienten mit PAH und Ratten im experimentellen Modell der PAH erhöhte Spiegel der DDAH-Substrate asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) und symmetrisches Dimethylarginin (SDMA), resultierend aus verminderter DDAH-Aktivität.^{142,143} ADMA inhibiert alle drei Isoformen der NO-Synthase und reduziert so die NO-Produktion, SDMA vermindert die Aufnahme von Arginin in die Zelle.¹⁴⁴ Dieser Eingriff in den NO-Metabolismus könnte eine wichtige pathogenetische Rolle bei der PAH spielen.

Die ebenfalls signifikant in der Expression gesteigerte miR-744 ist bisher nicht als hypoxie-reguliert beschrieben und dazu weitaus weniger erforscht als miR-210. Die Expression von miR-744 konnte bereits in verschiedenen Zellen nachgewiesen werden, eine Induktion ist in weißen Blutzellen bei Lupus-Nephritis beschrieben¹⁴⁵, die Verwendung als Biomarker für das Magenkarzinom wird diskutiert.¹⁴⁵ In Zusammenhang mit der PAH ist miR-744 bisher unbekannt. Eine von Martin et al.¹⁴⁶ beschriebene Rolle als Regulator von TGF- β 1 könnte hier jedoch eine Verbindung darstellen, da die Aktivierung von TGF- β pro-proliferativ ist und pulmonal-vaskuläres Remodelling fördert.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ Die Aktivierung der Expression von miR-744 könnte also als Reaktion auf die gesteigerte Expression von TGF β verstanden werden und damit eine negative Rückkopplung darstellen. Die Untersuchung der validierten Zielgene im mRNA-Array zeigte eine deutliche Reduktion des *immediate-early response gene 5* (IER5, 95%-KI -0,45...-2,17) und der 1-Acylglycerol-3-Phosphat-O-Acyltransferase 3 (AGPAT3, 95%-KI -0,18...-0,3). Die Blockade von IER5 in HeLa-Zellen fördert pro-proliferative Effekte und erhöht die Anzahl von Zellen in der S-Phase des Zellzyklus und führt so zur verbesserten Resistenz auf Gammastrahlen.¹⁵⁰ Eine ähnliche Aufgabe im hypoxie-bedingten zellulärem Stress in Pulmonalarterienfibroblasten unter Hypoxie wäre vorstellbar. Die Aufgaben der AGPAT3 sind weitgehend unbekannt.

Diskussion

Bisherige Erkenntnisse über miR-183 konzentrieren sich auf zwei Schwerpunkte: die Beteiligung an neuronal-sensorischen Signalwegen in Gehirn¹⁵¹, Retina¹⁵² und Innenohr¹⁵³ und eine Involvierung in verschiedenen Tumoren z.B. dem Prostatakarzinom¹⁵⁴ und Ovarialkarzinom.¹⁵⁵ Auch für das Adenokarzinom der Lunge wurde eine Rolle von miR-183 in Tumor Initiations-Zellen (TICs) beschrieben¹⁵⁶ und eine Fall-Kontroll-Studie mit 114 Patienten diskutiert eine potentielle Eignung der Messung erhöhter miR-183 als im Plasma messbarer Risikofaktor für Lungenkrebs.¹⁵⁷ In Zellen eines hepatozellulären Karzinoms wurde die Inhibierung einer TGF- β 1 induzierten Apoptose über die Blockade des Gens *Programmed Cell Death 4* (PDCD4) durch signifikant erhöhte miR-183-Spiegel nachgewiesen. Die zu erwartende erhöhte Expression von PDCD4 durch verminderte Expression von miR-183 wie in humanen Lungenfibroblasten unter Hypoxie, würde also den TGF- β 1-Signalweg verstärken. Auf mRNA-Ebene kann jedoch keine deutliche Regulation von PDCD4 nachgewiesen werden (Faktor 1,18; $p_{\text{fdr}} = 0,38$). Eine biologische Verbindung zu TGF- β 1 ist jedoch in jedem Fall ein Hinweis auf einen potentiellen modulatorischen Einfluss auf diesen Signalweg, und damit u.U. auch von Bedeutung für die Entwicklung einer PAH. Für verschiedene andere validierte Zielgene von miR-183 kann eine gesteigerte Expression der mRNAs beobachtet werden. So ist für das Zielgen *Homebox A5* (HOXA5; 95%-KI 0,12...0,54) auch bei pulmonaler Hypertension eine erhöhte Expression beschrieben worden.¹⁵⁸ Die Induktion von HOXA5 wird direkt ohne weitere Proteinbeteiligung durch Retinolsäure induziert¹⁵⁹, eine verminderte Repression durch miR-183 könnte hier ursächlich sein. Retinolsäuren beeinflussen über Hox-Gene für Regeneration und Differenzierung bei gesunden und kranken Zellen essentielle Prozesse.¹⁶⁰ Das Zielgen insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R, 95%-KI 0,19...0,44) aktiviert die Angiogenese über die Kette STAT3, HIF1 α und VEGF.¹⁶¹ Die höchste Steigerung der Expression verzeichnet das Zielgen Thioredoxin interacting protein (TXNIP, 95%-KI 1,16...1,41). Dieses supprimiert die HIF-Aktivität und ist eigentlich als negativ korreliert mit VEGF beschrieben worden¹⁶², welches jedoch in den Pulmonalarterienfibroblasten deutlich gesteigert exprimiert wird (VEGFA Faktor 1,729; $p_{\text{fdr}} = 0.00014$). HIF1 α jedoch ist nach 24h Hypoxie auf mRNA-Ebene signifikant vermindert (Faktor 0,41 $p_{\text{fdr}} = 0,0045$). Die genaue Rolle von TXNIP ist in diesem Versuchsaufbau also zunächst widersprüchlich, eine deutliche Supprimierung von HIF1 α jedoch apparent. Die Ursache dafür könnte eine negative Rückkopplung auf die zu Beginn der Hypoxie gesteigerte HIF-Synthetisierung sein. Auch das *trinucleotide repeat containing 6B* (TNRC6B, 95%-KI 0,17...0,74) korreliert negativ zur Repression von miR-183. Als Teil der GW-182 Proteinfamilie interagiert dieses mit allen menschlichen Argonaute-Proteinen (Ago) und ist damit essentiell für das miRNA-vermittelte *gene silencing*.¹⁶³ Dies könnte für eine Reaktion auf die ge-

Diskussion

steigerte Hydroxylierung und damit Aktivierung von Ago-Proteinen unter Hypoxie stehen¹⁶⁴ und allgemein die Genregulation durch miRNAs fördern.

Die in diesem Experiment induzierte miR-296-5p ist bisher wenig erforscht. Validiert ist u.a. das Zielgen *Human with-no-lysine kinase-4* (hWnk4), welches über die Regulation von Ionen-Transportern bei der Pathophysiologie der Hypertension eine Rolle einnimmt.¹⁶⁵ Darüber hinaus bekannt ist das Zielgen *hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate* (HGS), welches die Wachstumsfaktoren-Rezeptoren VEGF2 und PDGFR β degradiert. Eine Inhibition von miR-296 führt *in vivo* zu reduzierter Angiogenese in Tumoren.¹⁶⁶ Die mRNA-Analyse der validierten Zielgene führt zu keinem richtungsweisenden Ergebnis. Die Gründe hierfür könnten sowohl in der verhältnismäßig geringen Anzahl der validierten Zielgene als auch an der möglicherweise untergeordneten Rolle von miR-296 für den gezeigten Versuch liegen, so dass der Effekt der miRNA durch gegenläufige Prozesse maskiert wird.

Systematisch betrachtet kann zunächst zusammengefasst werden, dass die beobachtete Expressionsänderung im miRNA-Profil humaner Pulmonalarterienfibroblasten unter Hypoxie sich deutlich von dem bisher in PASMCs und pulmonalen Endothelzellen beobachteten Muster unterscheidet. So wurde keine deutliche Regulation der in diesem Zusammenhang beschriebenen miRNAs miR-17, 20a, -21, -204, oder -328. Die Induktion von miR-744 und -210 und die Repression von miR-183 dagegen ist bisher in der Pulmonalarterie nicht beschrieben, kann jedoch zusammen mit den mRNA-Expressiondaten in sinnvolle Zusammenhänge eingeordnet werden. Die miRNA-Expression der Pulmonalarterie scheint also Kompartiment-spezifisch zu sein. Eine Übersicht der in verschiedenen Modellen der PAH dysregulierten miRNAs zeigt Tabelle 4.1. Abbildung 4.1 stellt ein mögliches Modell der spezifischen Reaktion des Fibroblasten dar:

Durch Hypoxie werden miR-210 und -744 induziert, miR-183 wird supprimiert. Die Aktivierung der miR-210 Expression geschieht über HIF1 α , die Aktivierung von miR-744 ist dagegen unklar reguliert, könnte jedoch lediglich Folge einer negativen Rückkopplung der gesteigerten Aktivität von TGF β sein (?^A) oder durch einen unbekanntem Mediator direkt durch Hypoxie verursacht werden(?^B). Auch die Repression von miR-183 könnte ein unbekannter Mediator als Reaktion auf Hypoxie verursachen (?^C). Eine weitere Erklärung könnte eine Repression durch Retinolsäure sein (?^D), welche mit Hypoxie und HIF1 α in Verbindung steht.¹⁶⁷ Interessant ist in diesem Zusammenhang besonders, dass Retinolsäure ohne Proteineinfluss HOXA5 reguliert¹⁵⁹, denn hierfür könnte miR-183 ursächlich sein.

MiR-210 fördert als eine zentrale Hypoxie-miRNA Zelldifferenzierung, Zellzyklusarrest, reduziert die NO-Produktion und steigert ROS-Produktion, Angiogenese,

Diskussion

Chemotaxis und Proliferation.^{120,129,135,137,138} Damit trifft miR-210 mit der Pathogenese der PAH zumindest theoretisch gleich auf mehreren Ebenen zusammen:^{7,11-14}

1. Über die erhöhte Tendenz zur Differenzierung könnten sich Fibroblasten zu Myofibroblasten differenzieren.
2. Das Zusammenspiel von weniger dilatierendem NO und vermehrt ROS führte zur vermehrten Kontraktion benachbarter PASMCs und damit zur Vasokonstriktion.
3. Die gesteigerte VEGF-Produktion könnte die vermehrte Bildung von Vasa vasorum in großen Pulmonalarterien induzieren.
4. Durch chemotaktische Signale via β PDGFR könnten PASMCs zur Proliferation angeregt werden.
5. β PDGFR förderte weiterhin Proliferation und Remodelling.

Die Micro-RNA miR-744 förderte ebenfalls Proliferation und Remodelling über die Blockade von IER5.¹⁵⁰ Gleichzeitig würde diesen Mechanismen über die Blockade von TGF β entgegen gewirkt.

Die verminderte Expression von miR-183 begünstigte die differentielle Regulierung von HIF1 α als ein Zusammenspiel von IGF1 über STAT3 (verstärkend) und dem supprimierenden TXNIP. Darüber hinaus könnte auch hier ein negatives Feedback durch miR-210 beteiligt sein (?^E). HOXA5 würde ein Gegengewicht zu pro-angiogenetischen Faktoren wie VEGF bilden.¹⁶⁸

Betrachtet man dieses Modell in Hinsicht auf etwaige therapeutische Konzepte der PAH, wäre die Supprimierung von miR-210 am vielversprechendsten, da von dieser einige zentrale pathogenetische Prozesse auszugehen scheinen. So könnten in der Adventitia selbst Angiogenese und Proliferation gehemmt werden und durch die Steigerung der NO-Produktion und Verminderung chemotaktischer Reize Kontraktilität und Proliferation besonders in der benachbarten Media gehemmt werden. Eine Blockade von miR-744 würde zwar die pro-proliferative Hemmung von IER5 vermindern, jedoch auch die anti-proliferative Antagonisierung von TGF β reduzieren. Ebenso wäre die Induktion von miR-183 aufgrund der ebenfalls ausgewogenen Rolle für eine Verbesserung einer PAH nicht vielversprechend.

Die wichtige Rolle der Adventitia in der frühen Phase der Reaktion der Pulmonalarterie auf chronische Hypoxie wird durch die hier präsentierten Ergebnisse unterstrichen und um eine wichtige miRNA-Komponente erweitert. Insbesondere miR-210 beeinflusst die Entwicklung hin zur hypoxie-induzierten PAH fundamental gleich auf mehreren Ebenen und nimmt vermutlich eine zentrale Rolle ein, wenngleich zur weiteren Vervollständigung des hier präsentierten pathogenetischen Konzeptes weitere For-

Diskussion

schung zur Validierung der erstellten Hypothesen und Zusammenhänge notwendig ist. Hierzu wurden jedoch eine ganze Reihe möglicher Ansätze geschaffen (Abbildung 4.1) und damit ein wichtiges Ziel dieser Arbeit erfüllt.

Kompartiment / Zelle	Regulierte miRNAs	
	Mensch	Maus / Ratte
PAFb / Adventitia	miR-210 ↑ miR-744 ↑ miR-183 ↓	miR-21 ↓ ⁷² miR-30c ↓ ⁷² let-7f ↓ ⁷²
PASMC / Media	miR-204 ↓ ⁷³ miR-21 ↓ ¹⁶⁹	miR-204 ↓ ⁷³ miR-22 ↓ ⁷² miR-30c ↓ ⁷² miR-21 ↑ ¹⁷⁰
Endothelzelle / Intima		miR-21 ↓ ¹⁶⁹
Pulmonalarterie		miR-328 ↓ ¹⁷¹
Lunge	miR-21 ↓ ⁷²	miR-451 ↑ ⁷² miR-322 ↑ ⁷² miR-30c ↓ ⁷² miR-22 ↓ ⁷² miR-21 ↓ ⁷² let-7a ↓ ⁷² let-7f ↓ ⁷² miR-17 ↑ ⁷⁵ miR-92a ↑ ⁷⁵

Tabelle 4.1 Regulierte miRNAs in verschiedenen PAH-Modellen

4.3 Versuchsreihe Maus-Myokard

Die Versuchsreihe Maus-Myokard stellt die erste Anwendung der etablierten Plattform in größerer Serie von 70 Microarrays dar. Bei der Betrachtung der Durchführungsbilanz fällt zunächst die homogen über alle Gruppen verteilte Labelling-Ausfallquote von 23% (16/70) auf. Die hieraus zu ziehenden Schlussfolgerungen wurden bereits im Kapitel 4.1.1 näher erörtert. Insgesamt ist der Einfluss der Labelling-Ausfälle auf die Ergebnisqualität bei dieser großen Versuchsreihe jedoch als akzeptabel zu betrachten, da weiterhin ausreichend Messwerte zur Analyse zur Verfügung stehen.

Auf der biologischen Ebene steigt in der Infarkt- und der Reflow-Gruppe zum späteren Zeitpunkt die Zahl der regulierten miRNAs im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich an. In beiden Gruppen verhalten sich die miRNAs jedoch sehr ähnlich, so dass zwischen Infarkt und Reflow an gleichen Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden können.

Besonders auffällig ist die an allen Tagen sehr stark zu beobachtende hohe und deutlich signifikante Steigerung der Expression von miR-21 (siehe auch Abbildung 3.21). MiR-21 ist besonders in kardiovaskulären Zusammenhängen eine viel diskutierte miRNA, jedoch auch bei anderen Erkrankungen vermehrt exprimiert.^{173,174} So beschreiben z.B. Dong et al. eine gesteigerte Expression von miR-21 in Infarkt-Randgebieten im Gegensatz zu einer verminderten Expression in infarziertem Gewebe selbst. Durch Überexpression von miR-21 gelang es der Arbeitsgruppe außerdem, die Infarktgröße im Rattenmodell zu reduzieren.¹⁷² MiR-21 scheint folglich eine kardioprotektive Wirkung zu haben und ist damit vielversprechend für die Entwicklung therapeutischer Optionen. Die deutliche Induktion dieser miRNA im vorliegenden Versuchsaufbau kann insgesamt als starkes Argument für die Validität des Versuchsaufbaus bewertet werden. Anhand der signifikanten Überexpression in allen behandelten Gruppen kann zudem ein Hinweis für die fehlenden Unterschiede zwischen Infarkt und Reflow im vorliegenden Modell gesehen werden. So könnten bei der Präparation der Mäuse mit Myokardinfarkt die Randgebiete möglicherweise überrepräsentiert sein und so Unterschiede zur Reflow-Gruppe maskieren. Dong et al. analysieren jedoch die Regulation von miRNAs bereits 6h nach Infarkt. An den hier untersuchten Zeitpunkten nach zwei, fünf oder zehn Tagen kann dagegen eine anfangs vermindert exprimierte miRNA auch im weiteren Verlauf induziert werden. Dieses Verhalten zeigen u.a. miR-700, -214, -199a-3p, -199a-5p, -199b und -199b* (siehe Abbildung 3.23). Dadurch ist zusammenfassend die Vergleichbarkeit der vorliegenden Daten mit denen in der Publikation von Dong et al. präsentierten Daten eingeschränkt. Die verminderte Expression

Diskussion

von miR- 499, -199a-3p, -100 und die gesteigerte Expression von miR-214 und -223 decken sich jedoch ebenfalls mit den Beobachtungen von Dong et al. in Bezug auf das Infarktareal.

Ein Hauptziel der kardiovaskulären miRNA-Forschung ist die Verwendung von miRNAs als Biomarker für den Myokardinfarkt. Die beobachteten erhöhten Plasmaspiegel von miR-499 in Patienten mit Myokardinfarkt^{173,174} können in dem hier durchgeführten Experiment nicht erklärt werden, da die miRNA in allen Gruppen vermindert exprimiert wird. Auch die von anderen Arbeitsgruppen beobachteten Veränderungen im Plasmaspiegel der miR-1, -133a, -133b-, -122 und -375 können in diesem Mausmodell nicht erklärt werden.¹⁷⁴ Hierbei handelt es sich jedoch um ein gängiges Phänomen der miRNA-Forschung, welche gesamt betrachtet häufig ambivalente Ergebnisse in unterschiedlichen Arbeitsgruppen liefert.^{72,169,170} Diese Beobachtung könnte in der Verbreitung verschiedenster miRNA-Analysemethoden und Unterschieden im experimentellen Aufbau begründet sein.^{72,169}

Da miRNAs manchmal blockweise als sog. *cluster* reguliert werden, d.h. die Genloci der exprimierten miRNAs unmittelbar nebeneinander liegen lohnt sich die Analyse der ggf. gemeinsamen Regulation verschiedener miRNAs. Hierzu kann man zunächst die genomische Lokalisation der miRNAs betrachten und dann die Expressionsdaten bezüglich einer gemeinsamen Regulation überprüfen. Tabelle 4.2 zeigt die Chromosomenloci der bereits in Abbildung 3.23 visualisierten deutlich ($|LFC| > 1$) und signifikant ($p_{FDR} < 0.05$) regulierten miRNAs sowie die Richtung der Regulation an den verschiedenen Zeitpunkten in Infarkt und Reflow. MiR-214* / -214 / -199 sowie miR-292-3p / -291b-5p bilden jeweils ein sog. *cluster*. Die erhobenen Messwerte bestätigen die entsprechend gleiche Regulation der miRNAs innerhalb des *clusters*. Als Nebenbeobachtung fällt eine Überrepräsentation von miRNAs auf Chromosom 11 auf, die jedoch nicht in einem *cluster* zusammengelagert sind. Nicht oder gegenteilig regulierte miRNAs, welche trotzdem in einem *cluster* zusammengelagert sind können nicht ermittelt werden.

Chromosom	Name	Id2	Id5	Id10	Rd2	Rd5	Rd10
chr1: 162223368-162223477 [+]	mmu-miR-214*	+ / -	+	+	+ / -	+	+
chr1: 162223368-162223477 [+]	mmu-miR-214	+ / -	+	+	+ / -	+	+
chr1: 162217814-162217923 [+]	mmu-miR-199 (-2)	-	+	+	-	+	+
chr1: 92850378-	mmu-miR-149	-	-	-	-	-	-

Diskussion

92850443 [+]							
chr1: 195037040- 195037120 [+]	mmu-miR-29b(-2)	-	-	-	-	-	-
chr2: 32318460- 32318569 [+]	mmu-miR-199b*	-	+ / -	+	-	+ / -	+
chr2: 32318460- 32318569 [+]	mmu-miR-199b	-	+	+	-	+	+
chr2: 155622880- 155622958 [+]	mmu-miR-499	-	-	-	-	-	-
chr4: 135416555- 135416633 [-]	mmu-miR-700	-	+	+	-	+	+
chr6: 31063023- 31063093 [-]	mmu-miR-29b(-1)	-	-	-	-	-	-
chr7: 3219189- 3219270 [+]	mmu-miR-292-3p	+	+	+	+ / -	+	+
chr7: 3219482- 3219560 [+]	mmu-miR-291b-5p	+	+	+	+ / -	+	+
chr7: 142577064- 142577147 [-]	mmu-miR-675-3p	-	-	-	-	-	-
chr8: 107551244- 107551313 [+]	mmu-miR-140	+ / -	+ / -	+	+ / -	+	+
chr8: 105308364- 105308460 [-]	mmu-miR-328	-	-	-	-	-	-
chr9: 41531425- 41531504 [+]	mmu-miR-100	-	-	-	-	-	+ / -
chr9: 21496495- 21496564 [-]	mmu-miR-199(-1)						
chr10: 120447991- 120448110 [-]	mmu-miR-763	+ / -	+	+	+ / -	+	+
chr11: 87756864- 87756927 [+]	mmu-miR-142-5p	+	+	+	+	+	+
	mmu-miR-142-3p	+	+	+	+	+	+
chr11: 70012043- 70012131 [+]	mmu-miR-324-5p	-	+	+	+ / -	+	+ / -
chr11: 75173388- 75173478 [+]	mmu-miR-212	-	+ / -	+	-	+ / -	+ / -
chr11: 79711969- 79712034 [+]	mmu-miR-193	+ / -	+	+	+ / -	+	+
chr11: 86584067- 86584158 [-]	mmu-miR-21	+	+	+	+	+	+

Diskussion

chr11: 120014765- 120014862 [-]	mmu-miR-338-5p	-	-	-	-	-	-
chr12: 69763835- 69763944 [-]	mmu-miR-681	+	+	+	+ / -	+	+
chr12: 109595327- 109595388 [+]	mmu-miR-136	+ / -	+	+	+ / -	+	+
chr15: 82198122- 82198190 [+]	mmu-miR-33	+ / -	+	+	+	+	+
chr18: 61397835- 61397900 [-]	mmu-miR-378	-	-	-	-	-	-
chrX: 53053255- 53053353 [-]	mmu-miR-351	+	+	+	+	+	+
chrX: 96242817- 96242926 [+]	mmu-miR-223	+	+	+	+	+	+

Tabelle 4.2 Chromosomenloci der signifikant regulierten miRNAs mit LFC > 1 nach miRBase V19

Nicht mehr gelistete miRNAs entfernt: mmu-miR-689, mmu-miR-720 . Fett umrandet: miRNA *cluster*. (+) Induktion, (-) Suppression, (+/-) keine Änderung. Rd2: Reflow Tag 2 usw. Id2: Infarkt d2 usw.

Zusammenfassend kann man zunächst konstatieren, dass mit der Großserie von Microarrays der Nachweis der Praktikabilität und Funktion der etablierten miRNA-Microarray-Plattform auf Basis des miChips erbracht werden konnte. Die Regulation von miRNAs beim Myokardinfarkt ist jedoch sehr komplex, da sowohl zeitlich als auch örtlich im Myokard unterschiedliche Regulationen von miRNAs parallel ablaufen.¹⁷² Insbesondere miR-21 stellt einen vielversprechender Forschungsansatz für das weitere Verständnis der Funktion von miRNAs im Rahmen eines Myokardinfarktes dar und bietet zudem ein potentielles therapeutisches Potential. In den gezeigten Experimenten konnten weitere, bisher im Zusammenhang mit myokardialer Ischämie unbekannt, miRNAs identifiziert werden. Hiervon ausgehend können neue Ansätze und Experimente entwickelt werden, um das Verständnis der Rolle von miRNAs beim Myokardinfarkt zu ergänzen.

4.4 Bioinformatik

4.4.1 Datenverarbeitung und -analyse mit R

In dieser Arbeit wurde das Programm R zur Verarbeitung und Analyse von Daten benutzt, da hierdurch einige relevante Vorteile entstehen. Zunächst ermöglicht R durch die Möglichkeit Befehle in Funktionen zu gruppieren jederzeit schnell reproduzierbare und automatisierte Einzelschritte der Auswertung, welche gesammelt in ein Skript integriert werden können. Da sich bei Microarrays unter der Voraussetzung, dass (wie nach Etablierung üblich) der Hersteller des Arrays beibehalten wird, am Format des Ausgangsdatensatzes (Intensitätswerte) nichts oder nur wenig (z.B. bei Versions-Update) ändert, kann man die Intensitätswerte durch ein einmalig erstelltes R-Skript in kurzer Zeit einlesen, filtern und sortieren lassen. Durch minimale Modifikationen im Skript selbst, kann man dieses dann auf eventuelle Bedürfnisse weiter anpassen (z.B. Wechsel des Organismus). Auch die weitere Auswertung bis hin zur Erstellung von Abbildungen und Textdateien Ergebnistabellen kann nach diesem Schema durch Skripte durchgeführt werden. Die Erstellung von Skripten wird dabei durch die freie Verfügbarkeit zahlreicher Sammlungen von Funktionen (R *packages*, z.B. *limma*) unterstützt und ist nur wenigen Schranken unterworfen.

Die Nachteile von R sind im Wesentlichen durch die Komplexität des Programmierens bedingt, welche eine längere Einarbeitung erfordert. So können möglicherweise fehlerhafte Auswertungen durch (teils schwierig zu entdeckende) Fehler in eigenen Funktionen entstehen sowie im Nachhinein eigene oder fremde Funktionen aus Paketen schwierig nachzuvollziehen sein. Diesen Nachteilen kann jedoch durch die sorgfältige und schrittweise Erstellung von Funktionen mit Kommentaren entgegnet werden.

4.4.2 Zielgen- und Signalweganalyse anhand von miRNA-Microarrays

Die miRNA-Zielgen-Analyse ist eine Möglichkeit zur Konkretisierung von miRNA-Microarray-Ergebnissen auf durch die miRNAs gesteuerte mRNAs. So können die erhobenen Daten unter Umständen in einen zellulären Kontext integriert werden.

Die parallele Verwendung mehrerer Vorhersagealgorithmen soll dabei die Vor- und Nachteile verschiedener Algorithmen nivellieren und ist eine gängige Methode, die in leichten Modifikationen breite Anwendung findet.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ Durch die zusätzliche Information, welche Gene tatsächlich exprimiert sind (mRNA-Microarray-Daten) kann die Menge vorhergesagter Gene bereits sinnvoll um nicht Exprimierte reduziert werden. Tabelle 3.10 und Tabelle 3.11 zeigen deutliche Unterschiede der Vorhersagealgorithmen in

Bezug auf Anzahl der vorhergesagten Gene. So sagen Miranda und Mirbase zwar die höchste Anzahl tatsächlich regulierter Gene vor (141 bzw. 94 für $fdr < 0,1$ nach t-Wert), produzieren jedoch auch die höchste Anzahl falsch positiv vorhergesagter Gene und liegen damit relativ gesehen hinter Targetscan und Pictar. Die Vor- und Nachteile hiervon werden besonders an der nach Koeffizient errechneten Tabelle 3.11 deutlich. Sind anhand gegebener Kriterien nur wenige Gene überhaupt exprimiert oder reguliert (Betrag des Koeffizienten > 1), sind Miranda und Mirbase die einzigen Suchmaschinen, die regulierte Gene vorhersagen. Bei vielen Genen grenzen dagegen Pictar und Targetscan besser ein (Tabelle 3.10). Der Algorithmus Mirtarget 2 liegt in beiden Tabellen dazwischen. Vorteile für die ausschließliche Verwendung eines einzelnen Vorhersagealgorithmus lassen sich aus diesen Daten nicht ersehen und sind u.U. auch vom Datensatz abhängig. Die Kombination mehrerer Algorithmen ist daher in jedem Fall sinnvoll, die Wahrscheinlichkeit, ein reguliertes Gen vorherzusagen, liegt gepaart mit der Information über tatsächlich exprimierte Gene immerhin im Schnitt bei etwa 15%. Einschränkungen ergeben sich dann, wenn nur wenige Gene die Expression ändern oder die Auswahlkriterien nicht dem Datensatz individuell sinnvoll angepasst werden. Diese Tatsache wird auch anschaulich von den Abbildung 3.25 und Abbildung 3.24 aufgezeigt.

Der in dieser Arbeit entwickelte Wichtungsalgorithmus (Kap. 0) soll mit Hilfe der miRNA-Expressionsdaten und der Zielgenanalyse durch die Gesamtheit exprimierter miRNAs beeinflusste KEGG-Signalwege ermitteln. Im Gegensatz zur Zielgen-Analyse werden hierfür nicht nur die regulierten miRNAs näher betrachtet, sondern die quantitative Information aller miRNAs ausgenutzt. Das Prinzip entspricht einer *gene set enrichment analysis* nach Subramanian et al.¹⁷⁸ mit dem Ziel, funktionelle Aspekte von miRNA-Gruppen ohne die Durchführung weiterer Experimente betrachten zu können und ggf. von regulierten Gengruppen wieder Rückschlüsse auf miRNAs zu machen, deren Regulation im Microarray nicht eindeutig ist (externe Evidenz). So sollen Informationen der Microarrays genutzt werden, die durch die ausschließliche Betrachtung regulierter miRNAs verloren gehen. Der direkte Vergleich mit mRNA-Microarray-basierter KEGG-Signalweg-Analyse soll die Ergebnisse des Wichtungsalgorithmus hinterfragen. Die ermittelten Schnittmengen der Signalwege nach beiden Methoden von 61,2% (gewichtet nach dem t-Wert) und 67,7% (gewichtet nach dem Koeffizienten (siehe Tabelle 3.8 und Tabelle 3.9) zeigen, dass der Wichtungsalgorithmus überwiegend nachvollziehbare Ergebnisse liefert. Dieser kann also als orientierende Alternative zu aufwändigen Experimenten schon direkt im Anschluss an die Durchführung eines miRNA-Microarrays für dessen Integration in zelluläre Prozesse benutzt werden und so z.B. weiterführender Forschung eine Richtung vorgeben. Sinnvoll ist diese Anwendung

insbesondere, wenn man die vermutlich deutliche Beeinflussung von Signalwegen durch miRNAs zugrunde legt.³³

Inhaltlich ist die ermittelte Auswahl von KEGG-Signalwegen ebenfalls sinnvoll. So ist z.B. der bereits in Kapitel 4.2 diskutierte TGF- β -Signalweg vertreten, oder der ebenfalls Zellüberleben und Wachstum beeinflussende mTor-Signalweg. Auch Signalwege wie *Focal Adhesion, regulation of Actin cytoskeleton, ECM-receptor interaction* oder *adherens junction* sind bei Betrachtung der Funktion der Fibroblasten als Syntheseort der extrazellulären Matrix und deren Modifizierung unter Hypoxie nachvollziehbar, ebenso wie deren Beeinflussung durch miRNAs.

4.4.3 Zusammenfassung Bioinformatik

Die in diesem Kapitel diskutierten Ergebnisse zeigen, dass die Nutzung verschiedenster bioinformatischer Anwendungen und Standards nicht nur für Microarrays selbst, sondern insbesondere auch für die sinnvolle Integration von miRNAs in biologische Zusammenhänge unerlässlich sind. Für die Auswertung und Verarbeitung der Microarray-Daten kann anhand der vorliegenden Ergebnisse eine klare Empfehlung für die vsn- oder Quantilnormalisierung gegeben werden. Welche der beiden Methoden etwaige Vorteile bietet, sollte für den Einzelfall evaluiert werden, ebenso die Vor- und Nachteile der Verwendung einer Hintergrundkorrektur. Die Zielgen- und Signalweg-Analyse bietet viele Optionen, die Daten von miRNA-Expressionsprofilen in einen biologischen Kontext zu erweitern und kann, gestützt auf Literaturrecherchen, sinnvolle Zusammenhänge und Ideen für weiterführende Experimente aufzeigen. Die gemeinsame Betrachtung mit mRNA-Microarrays bietet die Möglichkeit mit überschaubarem experimentellem Aufwand die Ergebnisse der Zielgen- und Signalweg-Analyse zu sinnvoll auf exprimierte Gene zu reduzieren. Die in dieser Arbeit entwickelte Anwendung beschreibt eine mögliche und praktikable Verfahrensweise hierzu. Probleme ergeben sich durch die große Dynamik des Forschungsgebietes der miRNAs und fortlaufende Modifikationen von Datenbanken. So sind allein bei der Aktualisierung der miR-Base Version 19 auf 20 3355 neue Haarnadelstrukturen eingepflegt, 5393 miRNAs hinzugefügt, die miRNAs für 13 Spezies beschrieben und 98 falsche oder doppelte Sequenzen gelöscht worden.¹⁷⁹ Eine ständige Pflege und Überprüfung von Skripten ist daher obligat.

5 Literaturverzeichnis

1. Silbernagl S, Despopoulos A. *Taschenatlas der Physiologie*. Vol 6., korrigierte Auflage: Thieme Verlag; 2003.
2. Pschyrembel klinisches Wörterbuch. Vol 260. Auflage: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG; 2004:1069.
3. Von Euler U, Liljestrand G. Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta physiologica Scandinavica*. 1946;12:301-320.
4. Weissmann N, Grimminger F, Olschewski A, Seeger W. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response? *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. Aug 2001;281(2):L314-317.
5. Herold GuM. *Innere Medizin*: Herold; 2009.
6. Welsch U. *Lehrbuch Histologie*. Vol 2. Auflage: Urban & Fischer Verlag; 2006.
7. Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circulation research*. Sep 29 2006;99(7):675-691.
8. Arias-Stella J, Saldana M. The Terminal Portion of the Pulmonary Arterial Tree in People Native to High Altitudes. *Circulation*. Nov 1963;28:915-925.
9. Houston CS, Sutton JR, Cymerman A, Reeves JT. Operation Everest II: man at extreme altitude. *J Appl Physiol*. Aug 1987;63(2):877-882.
10. Groves BM, Reeves JT, Sutton JR, et al. Operation Everest II: elevated high-altitude pulmonary resistance unresponsive to oxygen. *J Appl Physiol*. Aug 1987;63(2):521-530.
11. Sartore S, Chiavegato A, Faggini E, et al. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circulation research*. Dec 7 2001;89(12):1111-1121.
12. Jones R, Jacobson M, Steudel W. alpha-smooth-muscle actin and microvascular precursor smooth-muscle cells in pulmonary hypertension. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. Apr 1999;20(4):582-594.
13. Sobin SS, Tremmer HM, Hardy JD, Chiodi HP. Changes in arteriole in acute and chronic hypoxic pulmonary hypertension and recovery in rat. *J Appl Physiol*. Nov 1983;55(5):1445-1455.
14. Stenmark KR, Davie N, Frid M, Gerasimovskaya E, Das M. Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology (Bethesda)*. Apr 2006;21:134-145.
15. Klug WC, MR; Spencer, CA. *Genetik*. Vol 8., aktualisierte Auflage 2007.
16. Visone R, Croce C. MicroRNA. In: Begley TP, ed. *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. Vol 4: John Wiley & Sons Inc.; 2009.
17. Chalfie M, Horvitz HR, Sulston JE. Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*. *Cell*. Apr 1981;24(1):59-69.
18. Ambros V, Horvitz HR. Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*. Oct 26 1984;226(4673):409-416.
19. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. Dec 3 1993;75(5):843-854.
20. Ruvkun G, Ambros V, Coulson A, Waterston R, Sulston J, Horvitz HR. Molecular genetics of the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-14*. *Genetics*. Mar 1989;121(3):501-516.
21. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*. Nov 2 2000;408(6808):86-89.
22. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. Feb 24 2000;403(6772):901-906.
23. Faculty of Life Sciences UoM. miRBase. V.18.0:<http://www.mirbase.org>. Accessed 30. Januar, 2012.
24. Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *The Plant cell*. Jul 2002;14(7):1605-1619.
25. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology*. Dec 2006;13(12):1097-1101.

26. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annual review of cell and developmental biology*. 2007;23:175-205.
27. Du T, Zamore PD. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*. Nov 2005;132(21):4645-4652.
28. Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature reviews. Molecular cell biology*. Jan 2007;8(1):23-36.
29. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews. Genetics*. Feb 2008;9(2):102-114.
30. Djuranovic S, Nahvi A, Green R. A parsimonious model for gene regulation by miRNAs. *Science*. Feb 4 2011;331(6017):550-553.
31. Hendrickson DG, Hogan DJ, McCullough HL, et al. Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS biology*. Nov 2009;7(11):e1000238.
32. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. Aug 12 2010;466(7308):835-840.
33. Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in Stress Signaling and Human Disease. *Cell*. Mar 16 2012;148(6):1172-1187.
34. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes & development*. Mar 1 2004;18(5):504-511.
35. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS biology*. Mar 2005;3(3):e85.
36. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular cell*. Jul 6 2007;27(1):91-105.
37. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*. Mar 2003;9(3):277-279.
38. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*. Jan 2011;39(Database issue):D152-157.
39. Griffiths-Jones S. miRBase: microRNA sequences and annotation. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]*. Mar 2010;Chapter 12:Unit 12 19 11-10.
40. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*. Jan 2008;36(Database issue):D154-158.
41. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res*. Jan 1 2004;32(Database issue):D109-111.
42. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*. Dec 1 2005;438(7068):685-689.
43. Ameres SL, Horwich MD, Hung JH, et al. Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. *Science*. Jun 18 2010;328(5985):1534-1539.
44. Stenvang J, Silahatoglu AN, Lindow M, Elmen J, Kauppinen S. The utility of LNA in microRNA-based cancer diagnostics and therapeutics. *Seminars in cancer biology*. Apr 2008;18(2):89-102.
45. Alexiou P, Maragkakis M, Papadopoulos GL, Reczko M, Hatzigeorgiou AG. Lost in translation: an assessment and perspective for computational microRNA target identification. *Bioinformatics*. Dec 1 2009;25(23):3049-3055.
46. Kiriakidou M, Nelson P, Lamprinaki S, Sharma A, Mourelatos Z. Detection of microRNAs and assays to monitor microRNA activities in vivo and in vitro. *Methods Mol Biol*. 2005;309:295-310.
47. Kiriakidou M, Nelson PT, Kouranov A, et al. A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes & development*. May 15 2004;18(10):1165-1178.
48. Maragkakis M, Reczko M, Simossis VA, et al. DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Res*. Jul 2009;37(Web Server issue):W273-276.
49. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS biology*. Nov 2004;2(11):e363.

Literaturverzeichnis

50. Lall S, Grun D, Krek A, et al. A genome-wide map of conserved microRNA targets in *C. elegans*. *Current biology : CB*. Mar 7 2006;16(5):460-471.
51. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*. Jan 2009;19(1):92-105.
52. Wang X. miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA*. Jun 2008;14(6):1012-1017.
53. Vergoulis T, Vlachos IS, Alexiou P, et al. TarBase 6.0: capturing the exponential growth of miRNA targets with experimental support. *Nucleic Acids Res*. Jan 2012;40(Database issue):D222-229.
54. Sethupathy P, Corda B, Hatzigeorgiou AG. TarBase: A comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets. *RNA*. Feb 2006;12(2):192-197.
55. Rottiers V, Naar AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2012;13(4):239-250.
56. Xu B, Hsu PK, Karayiorgou M, Gogos JA. MicroRNA dysregulation in neuropsychiatric disorders and cognitive dysfunction. *Neurobiology of disease*. Mar 3 2012.
57. Gardiner E, Beveridge NJ, Wu JQ, et al. Imprinted DLK1-DIO3 region of 14q32 defines a schizophrenia-associated miRNA signature in peripheral blood mononuclear cells. *Molecular psychiatry*. Jul 5 2011.
58. Yamaura Y, Nakajima M, Takagi S, Fukami T, Tsuneyama K, Yokoi T. Plasma MicroRNA Profiles in Rat Models of Hepatocellular Injury, Cholestasis, and Steatosis. *PLoS one*. 2012;7(2):e30250.
59. Roderburg C, Mollnow T, Bongaerts B, et al. Micro-RNA Profiling in Human Serum Reveals Compartment-Specific Roles of miR-571 and miR-652 in Liver Cirrhosis. *PLoS one*. 2012;7(3):e32999.
60. Ariel D, Upadhyay D. The role and regulation of microRNAs in asthma. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. Feb 2012;12(1):49-52.
61. Ezzie ME, Crawford M, Cho JH, et al. Gene expression networks in COPD: microRNA and mRNA regulation. *Thorax*. Feb 2012;67(2):122-131.
62. Wang R, Li N, Zhang Y, Ran Y, Pu J. Circulating MicroRNAs are promising novel biomarkers of acute myocardial infarction. *Intern Med*. 2011;50(17):1789-1795.
63. Zen K, Zhang CY. Circulating MicroRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. *Medicinal research reviews*. Mar 2012;32(2):326-348.
64. Xu J, Zhao J, Evan G, Xiao C, Cheng Y, Xiao J. Circulating microRNAs: novel biomarkers for cardiovascular diseases. *J Mol Med (Berl)*. Dec 8 2011.
65. Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, Kerin MJ. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Annals of surgery*. Mar 2010;251(3):499-505.
66. Junn E, Mouradian MM. MicroRNAs in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential. *Pharmacology & therapeutics*. Feb 2012;133(2):142-150.
67. Heyn J, Hinske C, Mohnle P, Luchting B, Beiras-Fernandez A, Kreth S. MicroRNAs as potential therapeutic agents in the treatment of myocardial infarction. *Current vascular pharmacology*. Nov 2011;9(6):733-740.
68. Boni V, Bandres E, Zarate R, Colucci G, Maiello E, Garcia-Foncillas J. MicroRNAs as a new potential therapeutic opportunity in gastrointestinal cancer. *Oncology*. 2009;77 Suppl 1:75-89.
69. Cho WC. Exploiting the therapeutic potential of microRNAs in human cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*. Feb 18 2012.
70. Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*. Jan 8 2010;327(5962):198-201.
71. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, et al. A microRNA signature of hypoxia. *Molecular and cellular biology*. Mar 2007;27(5):1859-1867.
72. Caruso P, MacLean MR, Khanin R, et al. Dynamic changes in lung microRNA profiles during the development of pulmonary hypertension due to chronic hypoxia and monocrotaline. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Apr 2010;30(4):716-723.

Literaturverzeichnis

73. Courboulin A, Paulin R, Giguere NJ, et al. Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *The Journal of experimental medicine*. Mar 14 2011;208(3):535-548.
74. Brock M, Trenkmann M, Gay RE, et al. Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenic protein receptor type II through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway. *Circulation research*. May 22 2009;104(10):1184-1191.
75. Pullamsetti SS, Doebele C, Fischer A, et al. Inhibition of microRNA-17 improves lung and heart function in experimental pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. Feb 15 2012;185(4):409-419.
76. Southern EM, Maskos U, Elder JK. Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models. *Genomics*. Aug 1992;13(4):1008-1017.
77. Fodor SP, Rava RP, Huang XC, Pease AC, Holmes CP, Adams CL. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature*. Aug 5 1993;364(6437):555-556.
78. Koehler AN. Microarrays in Chemical Biology. In: Begley TP, ed. *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. Vol 4: John Wiley & Sons Inc.; 2009.
79. Auer H, Lyianarachchi S, Newsom D, Klisovic MI, Marcucci G, Kornacker K. Chipping away at the chip bias: RNA degradation in microarray analysis. *Nature genetics*. Dec 2003;35(4):292-293.
80. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 2006;7:3.
81. Castoldi M, Benes V, Hentze MW, Muckenthaler MU. miChip: a microarray platform for expression profiling of microRNAs based on locked nucleic acid (LNA) oligonucleotide capture probes. *Methods*. Oct 2007;43(2):146-152.
82. Technologies A. Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis User Manual. 2010.
83. Jainchill JL, Aaronson SA, Todaro GJ. Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol* 1969; 1969/11/01:549-553.
84. Mason PE, Neilson GW, Dempsey CE, Barnes AC, Cruickshank JM. The hydration structure of guanidinium and thiocyanate ions: implications for protein stability in aqueous solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 15 2003;100(8):4557-4561.
85. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. Apr 1987;162(1):156-159.
86. Castoldi M, Schmidt S, Benes V, Hentze MW, Muckenthaler MU. miChip: an array-based method for microRNA expression profiling using locked nucleic acid capture probes. *Nat Protoc*. 2008;3(2):321-329.
87. Technologies A. Handbuch Agilent 2100 Bioanalyzer2005.
88. Panaro NJ, Yuen PK, Sakazume T, Fortina P, Kricka LJ, Wilding P. Evaluation of DNA fragment sizing and quantification by the agilent 2100 bioanalyzer. *Clin Chem*. Nov 2000;46(11):1851-1853.
89. Nanodrop. Nanodrop User's Manual2006.
90. Wilhelm J, Pingoud A. Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem*. Nov 7 2003;4(11):1120-1128.
91. Shingara J, Keiger K, Shelton J, et al. An optimized isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling. *RNA*. Sep 2005;11(9):1461-1470.
92. Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. Sep 25 2003;425(6956):415-419.
93. Castoldi M, Schmidt S, Benes V, et al. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *RNA*. May 2006;12(5):913-920.
94. Valoczi A, Hornyik C, Varga N, Burgyan J, Kauppinen S, Havelda Z. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(22):e175.
95. Bondensgaard K, Petersen M, Singh SK, et al. Structural studies of LNA:RNA duplexes by NMR: conformations and implications for RNase H activity. *Chemistry*. Aug 4 2000;6(15):2687-2695.
96. Nielsen KE, Rasmussen J, Kumar R, Wengel J, Jacobsen JP, Petersen M. NMR studies of fully modified locked nucleic acid (LNA) hybrids: solution structure of an

- LNA:RNA hybrid and characterization of an LNA:DNA hybrid. *Bioconjug Chem.* May-Jun 2004;15(3):449-457.
97. Petersen M, Bondensgaard K, Wengel J, Jacobsen JP. Locked nucleic acid (LNA) recognition of RNA: NMR solution structures of LNA:RNA hybrids. *J Am Chem Soc.* May 29 2002;124(21):5974-5982.
 98. Petersen M, Nielsen CB, Nielsen KE, et al. The conformations of locked nucleic acids (LNA). *J Mol Recognit.* Jan-Feb 2000;13(1):44-53.
 99. Yang YH, Dudoit S, Luu P, et al. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res.* Feb 15 2002;30(4):e15.
 100. Cui X, Churchill GA. Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome biology.* 2003;4(4):210.
 101. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2004;3:Article3.
 102. Reiner A, Yekutieli D, Benjamini Y. Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics.* Feb 12 2003;19(3):368-375.
 103. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J.R. Statist. Soc. B.* 1995;57(No.1):pp.289-300.
 104. Huber W, von Heydebreck A, Sultmann H, Poustka A, Vingron M. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics.* 2002;18 Suppl 1:S96-104.
 105. Papadopoulos GL, Reczko M, Simossis VA, Sethupathy P, Hatzigeorgiou AG. The database of experimentally supported targets: a functional update of TarBase. *Nucleic Acids Res.* Jan 2009;37(Database issue):D155-158.
 106. Schmidt S. unpublished results 2008.
 107. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, et al. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature genetics.* Jul 2003;34(3):267-273.
 108. Fromm B, Harris PD, Bachmann L. MicroRNA preparations from individual monogenean *Gyrodactylus salaris*-a comparison of six commercially available totalRNA extraction kits. *BMC research notes.* 2011;4:217.
 109. Xi Y, Nakajima G, Gavin E, et al. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA.* Oct 2007;13(10):1668-1674.
 110. Jung M, Schaefer A, Steiner I, et al. Robust microRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples. *Clin Chem.* Jun 2010;56(6):998-1006.
 111. Mraz M, Malinova K, Mayer J, Pospisilova S. MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples. *Biochemical and biophysical research communications.* Dec 4 2009;390(1):1-4.
 112. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 29 2008;105(30):10513-10518.
 113. Risso D, Massa MS, Chiogna M, Romualdi C. A modified LOESS normalization applied to microRNA arrays: a comparative evaluation. *Bioinformatics.* Oct 15 2009;25(20):2685-2691.
 114. Dabney AR, Storey JD. Normalization of two-channel microarrays accounting for experimental design and intensity-dependent relationships. *Genome biology.* 2007;8(3):R44.
 115. Lopez-Romero P, Gonzalez MA, Callejas S, Dopazo A, Irizarry RA. Processing of Agilent microRNA array data. *BMC research notes.* 2010;3:18.
 116. Silver JD, Ritchie ME, Smyth GK. Microarray background correction: maximum likelihood estimation for the normal-exponential convolution. *Biostatistics.* Apr 2009;10(2):352-363.
 117. Pradervand S, Weber J, Thomas J, et al. Impact of normalization on miRNA microarray expression profiling. *RNA.* Mar 2009;15(3):493-501.

Literaturverzeichnis

118. Li H, Ko HP, Whitlock JP. Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of Arnt and HIF1alpha. *J Biol Chem.* Aug 30 1996;271(35):21262-21267.
119. Leung AK, Sharp PA. MicroRNA functions in stress responses. *Molecular cell.* Oct 22 2010;40(2):205-215.
120. Devlin C, Greco S, Martelli F, Ivan M. miR-210: More than a silent player in hypoxia. *IUBMB life.* Feb 2011;63(2):94-100.
121. Huang X, Le QT, Giaccia AJ. MiR-210--micromanager of the hypoxia pathway. *Trends in molecular medicine.* May 2010;16(5):230-237.
122. Zhang Z, Sun H, Dai H, et al. MicroRNA miR-210 modulates cellular response to hypoxia through the MYC antagonist MNT. *Cell Cycle.* Sep 1 2009;8(17):2756-2768.
123. Zhang Y, Fei M, Xue G, et al. Elevated levels of hypoxia-inducible microRNA-210 in pre-eclampsia: new insights into molecular mechanisms for the disease. *Journal of cellular and molecular medicine.* Feb 2012;16(2):249-259.
124. Crosby ME, Kulshreshtha R, Ivan M, Glazer PM. MicroRNA regulation of DNA repair gene expression in hypoxic stress. *Cancer research.* Feb 1 2009;69(3):1221-1229.
125. Chan SY, Zhang YY, Hemann C, Mahoney CE, Zweier JL, Loscalzo J. MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing the iron-sulfur cluster assembly proteins ISCU1/2. *Cell metabolism.* Oct 2009;10(4):273-284.
126. Puissegur MP, Mazure NM, Bertero T, et al. miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity. *Cell death and differentiation.* Mar 2011;18(3):465-478.
127. Chen Z, Li Y, Zhang H, Huang P, Luthra R. Hypoxia-regulated microRNA-210 modulates mitochondrial function and decreases ISCU and COX10 expression. *Oncogene.* Jul 29 2010;29(30):4362-4368.
128. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem.* Jun 6 2008;283(23):15878-15883.
129. Hu S, Huang M, Li Z, et al. MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease. *Circulation.* Sep 14 2010;122(11 Suppl):S124-131.
130. Kim HW, Haider HK, Jiang S, Ashraf M. Ischemic preconditioning augments survival of stem cells via miR-210 expression by targeting caspase-8-associated protein 2. *J Biol Chem.* Nov 27 2009;284(48):33161-33168.
131. Mizuno Y, Tokuzawa Y, Ninomiya Y, et al. miR-210 promotes osteoblastic differentiation through inhibition of AcvR1b. *FEBS letters.* Jul 7 2009;583(13):2263-2268.
132. Qin L, Chen Y, Niu Y, et al. A deep investigation into the adipogenesis mechanism: profile of microRNAs regulating adipogenesis by modulating the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. *BMC genomics.* 2010;11:320.
133. Nakada C, Tsukamoto Y, Matsuura K, et al. Overexpression of miR-210, a downstream target of HIF1alpha, causes centrosome amplification in renal carcinoma cells. *The Journal of pathology.* Jun 2011;224(2):280-288.
134. Biswas S, Roy S, Banerjee J, et al. Hypoxia inducible microRNA 210 attenuates keratinocyte proliferation and impairs closure in a murine model of ischemic wounds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 13 2010;107(15):6976-6981.
135. Giannakakis A, Sandaltzopoulos R, Greshock J, et al. miR-210 links hypoxia with cell cycle regulation and is deleted in human epithelial ovarian cancer. *Cancer biology & therapy.* Feb 2008;7(2):255-264.
136. Tsuchiya S, Fujiwara T, Sato F, et al. MicroRNA-210 regulates cancer cell proliferation through targeting fibroblast growth factor receptor-like 1 (FGFRL1). *J Biol Chem.* Jan 7 2011;286(1):420-428.
137. Huang X, Ding L, Bennewith KL, et al. Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation. *Molecular cell.* Sep 24 2009;35(6):856-867.
138. Chan YC, Banerjee J, Choi SY, Sen CK. miR-210: The Master Hypoxamir. *Microcirculation.* Apr 2012;19(3):215-223.
139. Krick S, Hanze J, Eul B, et al. Hypoxia-driven proliferation of human pulmonary artery fibroblasts: cross-talk between HIF-1alpha and an autocrine angiotensin system. *The*

- FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. May 2005;19(7):857-859.
140. Davie NJ, Crossno JT, Jr., Frid MG, et al. Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. Apr 2004;286(4):L668-678.
 141. ten Freyhaus H, Dagnell M, Leuchs M, et al. Hypoxia enhances platelet-derived growth factor signaling in the pulmonary vasculature by down-regulation of protein tyrosine phosphatases. *American journal of respiratory and critical care medicine*. Apr 15 2011;183(8):1092-1102.
 142. Pullamsetti S, Kiss L, Ghofrani HA, et al. Increased levels and reduced catabolism of asymmetric and symmetric dimethylarginines in pulmonary hypertension. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Jul 2005;19(9):1175-1177.
 143. Sasaki A, Doi S, Mizutani S, Azuma H. Roles of accumulated endogenous nitric oxide synthase inhibitors, enhanced arginase activity, and attenuated nitric oxide synthase activity in endothelial cells for pulmonary hypertension in rats. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. Jun 2007;292(6):L1480-1487.
 144. Leiper J, Nandi M, Torondel B, et al. Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. *Nature medicine*. Feb 2007;13(2):198-203.
 145. Te JL, Dozmorov IM, Guthridge JM, et al. Identification of unique microRNA signature associated with lupus nephritis. *PloS one*. 2010;5(5):e10344.
 146. Martin J, Jenkins RH, Bennagi R, et al. Post-transcriptional regulation of Transforming Growth Factor Beta-1 by microRNA-744. *PloS one*. 2011;6(10):e25044.
 147. Davies RJ, Holmes AM, Deighton J, et al. BMP type II receptor deficiency confers resistance to growth inhibition by TGF-beta in pulmonary artery smooth muscle cells: role of proinflammatory cytokines. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. Mar 2012;302(6):L604-615.
 148. Gong K, Xing D, Li P, et al. Hypoxia induces downregulation of PPAR-gamma in isolated pulmonary arterial smooth muscle cells and in rat lung via transforming growth factor-beta signaling. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. Dec 2011;301(6):L899-907.
 149. Nasim MT, Ogo T, Chowdhury HM, et al. BMPR-II deficiency elicits pro-proliferative and anti-apoptotic responses through the activation of TGFbeta-TAK1-MAPK pathways in PAH. *Human molecular genetics*. Mar 13 2012.
 150. Ding KK, Shang ZF, Hao C, et al. Induced expression of the IER5 gene by gamma-ray irradiation and its involvement in cell cycle checkpoint control and survival. *Radiation and environmental biophysics*. Apr 2009;48(2):205-213.
 151. Juhila J, Sipila T, Icaý K, et al. MicroRNA expression profiling reveals miRNA families regulating specific biological pathways in mouse frontal cortex and hippocampus. *PloS one*. 2011;6(6):e21495.
 152. Zhu Q, Sun W, Okano K, et al. Sponge transgenic mouse model reveals important roles for the microRNA-183 (miR-183)/96/182 cluster in postmitotic photoreceptors of the retina. *J Biol Chem*. Sep 9 2011;286(36):31749-31760.
 153. Hei R, Chen J, Qiao L, et al. Dynamic changes in microRNA expression during differentiation of rat cochlear progenitor cells in vitro. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. Aug 2011;75(8):1010-1014.
 154. Teiten MH, Gaigneaux A, Chateauvieux S, et al. Identification of Differentially Expressed Proteins in Curcumin-Treated Prostate Cancer Cell Lines. *Omics : a journal of integrative biology*. Apr 4 2012.
 155. Li J, Liang S, Jin H, Xu C, Ma D, Lu X. Tiam1, negatively regulated by miR-22, miR-183 and miR-31, is involved in migration, invasion and viability of ovarian cancer cells. *Oncology reports*. Jun 2012;27(6):1835-1842.
 156. Lin S, Sun JG, Wu JB, et al. Aberrant microRNAs expression in CD133(+)/CD326 (+) human lung adenocarcinoma initiating cells from A549. *Molecules and cells*. Mar 2012;33(3):277-283.
 157. Zhu W, Liu X, He J, Chen D, Hunag Y, Zhang YK. Overexpression of members of the microRNA-183 family is a risk factor for lung cancer: a case control study. *BMC cancer*. 2011;11:393.

Literaturverzeichnis

158. Golpon HA, Geraci MW, Moore MD, et al. HOX genes in human lung: altered expression in primary pulmonary hypertension and emphysema. *The American journal of pathology*. Mar 2001;158(3):955-966.
159. Bernacki SH, Nervi C, Vollberg TM, Jetten AM. Homeobox 1.3 expression: induction by retinoic acid in human bronchial fibroblasts. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. Jul 1992;7(1):3-9.
160. Gudas LJ. Emerging roles for retinoids in regeneration and differentiation in normal and disease states. *Biochimica et biophysica acta*. Jan 2012;1821(1):213-221.
161. Gariboldi MB, Ravizza R, Monti E. The IGFR1 inhibitor NVP-AEW541 disrupts a pro-survival and pro-angiogenic IGF-STAT3-HIF1 pathway in human glioblastoma cells. *Biochemical pharmacology*. Aug 15 2010;80(4):455-462.
162. Farrell MR, Rogers LK, Liu Y, Welty SE, Tipple TE. Thioredoxin-interacting protein inhibits hypoxia-inducible factor transcriptional activity. *Free radical biology & medicine*. Nov 15 2010;49(9):1361-1367.
163. Eulalio A, Tritschler F, Izaurralde E. The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *RNA*. Aug 2009;15(8):1433-1442.
164. Wu C, So J, Davis-Dusenbery BN, et al. Hypoxia potentiates microRNA-mediated gene silencing through posttranslational modification of Argonaute2. *Molecular and cellular biology*. Dec 2011;31(23):4760-4774.
165. Mao J, Li C, Zhang Y, Li Y, Zhao Y. Human with-no-lysine kinase-4 3'-UTR acting as the enhancer and being targeted by miR-296. *The international journal of biochemistry & cell biology*. Sep 2010;42(9):1536-1543.
166. Wurdinger T, Tannous BA, Saydam O, et al. miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells. *Cancer cell*. Nov 4 2008;14(5):382-393.
167. Fernandez-Martinez AB, Arenas Jimenez MI, Lucio Cazana FJ. Retinoic acid increases hypoxia-inducible factor-1alpha through intracrine prostaglandin E(2) signaling in human renal proximal tubular cells HK-2. *Biochimica et biophysica acta*. Apr 2012;1821(4):672-683.
168. Liang Y, Xia L, Du Z, et al. HOXA5 inhibits keratinocytes growth and epidermal formation in organotypic cultures in vitro and in vivo. *Journal of dermatological science*. Jun 2012;66(3):197-206.
169. Drake KM, Zygmunt D, Mavrikakis L, et al. Altered MicroRNA processing in heritable pulmonary arterial hypertension: an important role for Smad-8. *American journal of respiratory and critical care medicine*. Dec 15 2011;184(12):1400-1408.
170. Yang S, Banerjee S, Freitas A, et al. miR-21 regulates chronic hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. Mar 2012;302(6):L521-529.
171. Guo L, Qiu Z, Wei L, et al. The MicroRNA-328 Regulates Hypoxic Pulmonary Hypertension by Targeting at Insulin Growth Factor 1 Receptor and L-Type Calcium Channel-alpha1C. *Hypertension*. Mar 5 2012.
172. Dong S, Cheng Y, Yang J, et al. MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction. *J Biol Chem*. Oct 23 2009;284(43):29514-29525.
173. Devaux Y, Vausort M, Goretti E, et al. Use of Circulating MicroRNAs to Diagnose Acute Myocardial Infarction. *Clin Chem*. Mar 2012;58(3):559-567.
174. D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *European heart journal*. Nov 2010;31(22):2765-2773.
175. Shirdel EA, Xie W, Mak TW, Jurisica I. NAViGaTing the microne--using multiple microRNA prediction databases to identify signalling pathway-associated microRNAs. *PloS one*. 2011;6(2):e17429.
176. Augustin R, Endres K, Reinhardt S, et al. Computational identification and experimental validation of microRNAs binding to the Alzheimer-related gene ADAM10. *BMC medical genetics*. May 17 2012;13(1):35.
177. Angerstein C, Hecker M, Paap BK, et al. Integration of MicroRNA Databases to Study MicroRNAs Associated with Multiple Sclerosis. *Molecular neurobiology*. May 2 2012.

Literaturverzeichnis

178. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 25 2005;102(43):15545-15550.
179. Faculty of Life Sciences UoM. The miRBase Sequence Database -- Release 19. <ftp://mirbase.org/pub/mirbase/CURRENT/README>. Accessed 01.06., 2014.

6 Veröffentlichungen

T. Dombrowski, L. Fink, C. Troidl, H.M. Nef, J. Wilhelm. *Comprehensive analysis of miRNA Expression in the Ischemia/Reperfusion-Infarctmodel in the mouse*. Posterpräsentation ECCPS-Symposium Bad Nauheim 2010

T. Dombrowski, L. Fink, J. Wilhelm. *Micro-RNA analysis of hypoxia-induced changes in human pulmonary arterial fibroblasts*. Posterpräsentation ECCPS-Symposium Bad Nauheim 2010

T. Dombrowski, L.Fink, J. Wilhelm. Micro-RNA-Profilung: *Establishment and analysis of hypoxia-induced changes in human lung fibroblasts*. Posterpräsentation Kongress der dt. Gesellschaft für Pathologie, Freiburg 2009

T. Dombrowski, L. Fink, J. Wilhelm. Micro-RNA-Profilung: *Establishment and analysis of hypoxia-induced changes in human lung fibroblasts*. Posterpräsentation ECCPS-Symposium Bad Nauheim 2008



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6370-2



9 783835 196370 2

