Universität Bremen*

ZENTRUM FÜR HUMANGENETIK

Untersuchungen zur Expression der microRNA-Gen-Cluster C19MC und miR-371-3 in Normalgeweben und Tumoren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

dem Promotionsausschuss des Fachbereichs Biologie/Chemie

der Universität Bremen

vorgelegt von

Inga Flor

Bremen, im Februar 2016

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörn Bullerdiek

2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Dotzauer

Datum des Kolloquiums:

15. April 2016

Inhaltsverzeichnis

I Abkürzungsverzeichnis I

1 Einleitung 1

2 Material und Methoden 8

2.1 Gewebeproben 8

2.2 Zellkultur 9

2.3 miRNA-Expressionsanalyse 9

2.3.1 RNA-Isolierung 9

2.3.2 cDNA-Synthese 9

2.3.3 Präamplifizierung 10

2.3.4 Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR) 10

2.4 DNA-Methylierungsanalyse 11

2.4.1 DNA-Isolierung 11

2.4.2 Bisulfit-Konvertierung 11

2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 11

2.4.4 Klonierung und Sequenzierung 11

2.5 Demethylierung mittels 5-Aza-2′-desoxycytidin 12

3 Ergebnisse 13

3.1 Publikation I: Activation of the two microRNA clusters C19MC and miR-371-3 does not play prominent role in thyroid cancer (Rippe, Flor et al., 2012) 13

3.2 Publikation II: Expression of microRNAs of C19MC in different histologic types of testicular germ cell tumour (Flor et al., im Druck) 24

3.3 Publikation III: The dark side of a success story: microRNAs of the C19MC cluster in human tumours (Flor und Bullerdiek, 2012) 29

3.4 Publikation IV: Abundant expression and hemimethylation of C19MC in cell cultures from placenta-derived stromal cells (Flor et al., 2012) 36

3.5 Publikation V: Exosome-delivered microRNAs of "chromosome 19 microRNA cluster" as immunomodulators in pregnancy and tumorigenesis (Bullerdiek und Flor, 2012). 46

4 Diskussion 52

5 Zusammenfassung 65

6 Summary 67

7 Literaturverzeichnis 69

8 Anhang 79

9 Publikationsübersicht 81

10 Danksagung 83

Erklärung 84

I Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl; µm	Mikroliter; -meter
5-Aza-dC	5-Aza-2′-desoxycytidin
AIX	Ampicillin, isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal)
ATC	anaplastisches Schilddrüsenkarzinom (*anaplastic thyroid carcinoma*)
BAC	*bacterial artificial chromosome*
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2 Synonym: Bcl-2
BCL2L1	BCL2-like 1 Synonym: Bcl-xL
Bcl-xL	siehe BCL2L1
bp	Basenpaare
BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
C19MC	*chromosome 19 microRNA cluster*
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)
CDK2	cyclin-dependent kinase 2
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
cDNA	*copy* DNA
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CIS	*carcinoma in situ*
Ct	*Cycle threshold*
CXCL6	chemokine (C-X-C motif) ligand 6
DGCR8	DGCR8 microprocessor complex subunit
DKK1	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	embryonales Karzinom (embryonal carcinoma)
ELAVL1	ELAV like RNA binding protein 1 Synonym: HuR (Hu antigen R)
ERK	mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Genfamilie)
ESC	embryonalen Stammzelle (embryonal stem cell)

ETMR	*embryonal tumours with multilayered rosettes*
EVT	extravillöser Trophoblast
FA	follikuläres Schilddrüsenadenom
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
FISH	Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung
FOXL2	forkhead box L2
FOXO3	forkhead box O3 Synonym: FOXO3A
FTC	follikuläres Schilddrüsenkarzinom (*follicular thyroid carcinoma*)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HuR	siehe ELAVL1
ISH	*in situ*-Hybridisierung
kb	Kilobasen
kV	Kilovolt
LATS2	large tumor suppressor kinase 2
LB	Lysogeny Broth Nährmedium
LCMD	*laser capture microdissection*
LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1
MAP3K2	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2 Synonym: MEKK2
MEK	mitogen-activated protein kinase kinases (MAP2K) (Genfamilie)
MEKK2	siehe MAP3K2
min	Minute
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
MMP14	matrix metallopeptidase 14 (membrane-inserted)
MMP2	matrix metallopeptidase 2
MMP9	matrix metallopeptidase 9
MRE	*miRNA recognition element*
mRNA	*messenger* RNA
ms	Millisekunde
MSC	mesenchymale Stamm-/Stromazelle (*mesenchymal stem/stromal cell*)

MTC	medulläres Schilddrüsenkarzinom (*medullary thyroid carcinoma*)
MTOR	mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)
MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NF-κB	nuclear factor “kappa-light-chain-enhancer” of activated B-cells
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NR4A2	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2
NSCLC	nicht-kleinzelliger Lungenkrebs (*non-small cell lung cancer*)
p. c.	*post conceptionem*
p21	siehe CDKN1A
p53	siehe TP53
p65	siehe RELA
PAX8	paired box 8
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes *(peripheral blood mononuclear cells)*
PDTC	gering differenziertes Schilddrüsenkarzinom (*poorly differentiated thyroid carcinoma*)
PPARG	peroxisome proliferator activated receptor gamma
pre-miRNA	*precursor* miRNA
pri-miRNA	*primary* microRNA
PRKG1	protein kinase, cGMP-dependent, type I
PTC	papilläres Schilddrüsenkarzinom (*papillary thyroid carcinoma*)
qRT-PCR	quantitative Real-time PCR
RAF	mitogen-activated protein kinase kinase kinases (MAP3K) (Genfamilie)
RAS	RAS type family GTPases (Genfamilie)
RELA	v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A Synonym: p65
RET	ret proto-oncogene
RISC	*RNA-induced silencing complex*
RNA	Ribonukleinsäure
RNU6-6P	RNA, U6 small nuclear 6, pseudogene Synonym: RNU6B (RNA, U6B small nuclear)

RNU6B	siehe RNU6-6P
rpm	Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*)
s	Sekunde
SIRT1	sirtuin 1
SSW	Schwangerschaftswoche
TBPC19	*thyroid adenoma breakpoint cluster* 19q13.4 (FISH-Sonde)
TGCTs	*testicular germ cell tumours*
TGFBR2	transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)
TGF-β	transforming growth factor beta
TIN	testikuläre intraepitheliale Neoplasie
TP53	tumor protein p53 Synonym: p53
Treg-Zelle	regulatorische T-Zelle
TTYH1	tweety family member 1
UTR	*untranslated region*
VT	villöser Trophoblast
WHO	Weltgesundheitsorganisation (*world health organisation*)
WNT	Wingless-type MMTV integration site family (Genfamilie)

1 Einleitung

microRNAs (miRNAs) sind kleine einzelsträngige RNA-Moleküle von ~ 22 Nukleotiden Länge, die bei der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression eine wichtige Rolle spielen. Sie unterdrücken die Expression ihres Ziel-Gens, indem sie an die entsprechende mRNA binden und die Hemmung der Translation bzw. die Spaltung der mRNA bewirken (Bartel, 2004). Auf diese Weise beeinflussen sie diverse zelluläre Prozesse wie Differenzierung, Entwicklung, Proliferation, Wachstum, Apoptose und Stoffwechsel.

Im menschlichen Genom wurden bisher fast 1900 miRNA-Gene identifiziert, die für knapp 2600 reife *(mature)* miRNAs codieren (*miRBase: the microRNA database*, 2014). Ca. 40 % aller Säugetier-miRNA-Gene sind in Introns proteincodierender Gene lokalisiert, weitere 40 % in Introns nicht-codierender Gene. Seltener befinden sich miRNA-Gene auch in Exons sowohl proteincodierender als auch nicht-codierender Gene (Kim et al., 2009a). Im menschlichen Genom liegen ca. 25 % der miRNA-Gene weniger als 10 kb vom nächsten miRNA-Locus entfernt (*miRBase: the microRNA database*, 2014). Die miRNAs solcher Cluster können durch einen gemeinsamen Promotor reguliert und in Form eines polycistronischen Transkripts transkribiert werden (Lee et al., 2002; Lee et al., 2004). miRNA-Gene werden in der Regel von der RNA-Polymerase II transkribiert, weshalb das primäre Transkript, *primary* miRNA (pri-miRNA) genannt, eine 5′-Cap-Struktur und einen 3′-Poly(A)-Schwanz trägt (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004). Die pri-miRNA kann mehrere hundert (Schanen und Li, 2010) bis einige tausend Basen lang sein und enthält eine oder (im Falle polycistronischer Transkripte) mehrere Stem-loop-Strukturen (Kim et al., 2009a). Die pri-miRNA wird in mehreren Schritten zur reifen miRNA prozessiert. Der erste Schritt, bei dem die pri-miRNA an der Basis des Stem-loops zur ~ 65–100 Nukleotide langen *precursor* miRNA (pre-miRNA) gespalten wird, findet im Zellkern statt (Davis-Dusenbery und Hata, 2010) und wird durch einen Enzymkomplex namens Microprocessor, bestehend aus der Typ III-RNase Drosha (Lee et al., 2003) und dem Hilfsfaktor DGCR8 (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Han et al., 2004; Landthaler et al., 2004), katalysiert. Anschließend bindet der Exportin 5/Ran-GTP-Komplex an die pre-miRNA und transportiert diese ins Cytoplasma (Yi et al., 2003). Hier spaltet Dicer, eine weitere Typ III-RNase, den Loop ab, so dass ein ~ 22 Nukleotide langer RNA-Doppelstrang entsteht. Mit Hilfe einer Helikase wird der

Doppelstrang entwunden (Schanen und Li, 2010) und anschließend einer der beiden Stränge in einen Multiprotein-Komplex, den RNA-induced silencing complex (RISC), aufgenommen. Der andere Strang wird entweder abgebaut oder wird ebenfalls von einem RISC inkorporiert. In letzterem Fall codiert ein miRNA-Gen also für zwei funktionelle reife miRNAs (*miRBase: the microRNA database*, 2014). Der RISC-miRNA-Komplex bindet nun an eine Bindungsstelle auf der mRNA des Ziel-Gens. Dieser Bindungsbereich (*miRNA recognition element* (MRE)) liegt meist in der 3′-UTR der Ziel-mRNA. Es besteht dabei in der Regel keine vollständige Komplementarität zwischen MRE und miRNA, jedoch ist meist die sogenannte Seed-Sequenz, eine Sequenz, die die Nukleotide 2–8 auf der miRNA umfasst, vollständig komplementär (Cowland et al., 2007). Die Bindung der miRNA an ihre Ziel-mRNA führt zur Unterdrückung der Translation, bei einer sehr hohen Komplementarität der miRNA zur Ziel-mRNA kann es auch zur Spaltung der mRNA kommen (Kim et al., 2009a).

Schätzungen zufolge werden zwischen 30 und 60 % aller menschlichen Gene von miRNAs reguliert (Friedman et al., 2009; Kim et al., 2009b). Eine mRNA kann dabei von vielen verschiedenen miRNAs reguliert werden und eine miRNA wiederum kann Hunderte von Ziel-Genen beeinflussen (Selbach et al., 2008). Potentielle Ziel-Gene einer miRNA können *in silico* mit Hilfe spezieller Programme ermittelt werden. Diese Programme verwenden zur Analyse verschiedene Merkmale von miRNA und mRNA, insbesondere die Komplementarität der Seed-Sequenz, die Konservierung der komplementären Sequenzen, die Änderung der Gibb's freien Energie bei der Bindung und die Zugänglichkeit der Bindungsstelle auf der mRNA (Peterson et al., 2014). Bei diesen Analysen ergeben sich allerdings häufig Tausende von Kandidaten-Genen. Der tatsächliche Einfluss einer miRNA auf die ermittelte mRNA muss daher stets experimentell validiert werden (Alexiou et al., 2009).

Das größte menschliche miRNA-Cluster liegt auf Chromosom 19 in der Bande q13.4 (Bentwich et al., 2005) und wird deshalb C19MC („chromosome 19 microRNA cluster") genannt (Abb. 1). Es umfasst einen Bereich von ca. 100 kb und besteht aus 46 miRNA-Genen bzw. pre-miRNAs, aus denen 62 reife miRNAs hervorgehen (Bentwich et al., 2005; Bortolin-Cavaillé et al., 2009; *miRBase: the microRNA database*, 2014) (siehe Tabelle 1 im Anhang). Zwischen den miRNAs des Clusters liegen Alu-Elemente verstreut angeordnet. miRNAs und Alu-Elemente zusammen machen ca. zwei Drittel des Clusters aus (Borchert et al., 2006).

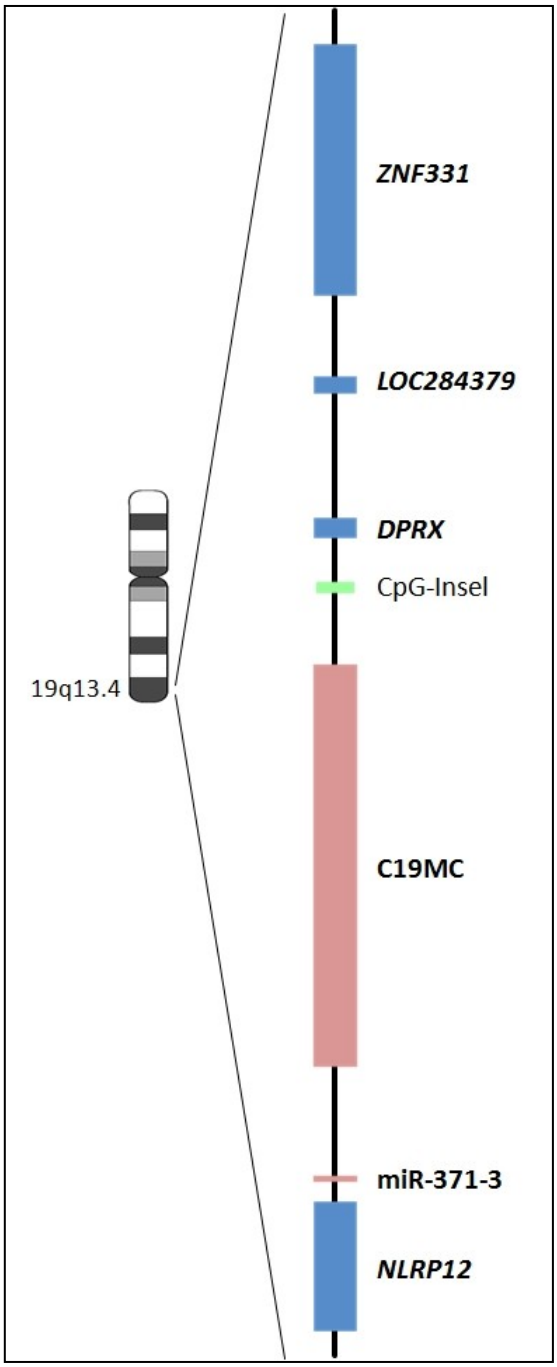

Abb. 1: Abschnitt der chromosomalen Bande 19q13.4 mit den miRNA-Clustern C19MC und miR-371-3 (rosa), CpG-Insel (grün) und proteincodierenden Genen (blau) (nach Bullerdiek und Flor, 2012).

Das gesamte Cluster wird offenbar in Form eines polycistronischen Transkripts von RNA-Polymerase II transkribiert und die einzelnen miRNAs anschließend aus diesem prozessiert (Bortolin-Cavaillé et al., 2009). Die Expression von C19MC ist abhängig vom Methylierungsstatus einer CpG-Insel in der Promotorregion ca. 17,6 kb *upstream* des Clusters. In C19MC nicht oder kaum exprimierenden Zellen ist die CpG-Insel hypermethyliert (Tsai et al., 2009). Viele der miRNAs von C19MC haben

die gleiche oder eine ähnliche Seed-Sequenz (Lin et al., 2010) und teilen diese Ähnlichkeit auch mit miRNAs eines weiteren Clusters, miR-371-3, welches ca. 25 kb *distal* von C19MC lokalisiert ist (Abb. 1). Im Gegensatz zu C19MC, welches primaten-spezifisch ist, ist miR-371-3 auch in Maus, Ratte und Hund konserviert (Bentwich et al., 2005). Dies deutet darauf hin, dass C19MC aus miR-371-3 hervorgegangen sein könnte und sich dann in der Linie der Primaten, vermutlich vermittelt durch die vorhandenen Alu-Elemente, durch Duplikationen und Mutationen weiterentwickelt hat (Zhang et al., 2008). miR-371-3 besteht aus drei miRNA-Genen, die für sechs reife miRNAs codieren. Ein weiteres miRNA-Gen dieses Clusters befindet sich möglicherweise auf dem Minusstrang (Persson et al., 2011; *miRBase: the microRNA database*, 2014) (siehe Tabelle 1 im Anhang). Über die Regulation von miR-371-3 ist relativ wenig bekannt, es wurde aber die transkriptionelle Aktivierung des Clusters durch den Transkriptionsfaktor MYC (Cairo et al., 2010) und durch β-Catenin/LEF1 (Zhou et al., 2012a) beschrieben. Beide Cluster werden normalerweise in adulten Zellen nicht bzw. gering exprimiert (Liang et al., 2007), jedoch stark in embryonalen Stammzellen (ESCs) (Bar et al., 2008; Cao et al., 2008; Laurent et al., 2008; Morin et al., 2008; Ren et al., 2009) und in der Plazenta (Bentwich et al., 2005; Liang et al., 2007; Bortolin-Cavaillé et al., 2009; Tsai et al., 2009). In der Plazenta macht insbesondere C19MC einen signifikanten Anteil an der Gesamtmenge an miRNAs aus (Liang et al., 2007) und einige Mitglieder von C19MC gehören zu den am stärksten exprimierten miRNAs (Landgraf et al., 2007; Mouillet et al., 2011; Donker et al., 2012). Die Expression von C19MC erfolgt dabei ausschließlich vom paternalen Allel (Noguer-Dance et al., 2010). Sie bleibt in der Plazenta während der gesamten Schwangerschaft bestehen, wohingegen im Fetus in der 20. Schwangerschaftswoche lediglich noch im Gehirn einzelne C19MC-miRNAs exprimiert werden (Zhang et al., 2008).

C19MC und miR-371-3 sind in verschiedenen Tumorentitäten reaktiviert und mit onkogenen Funktionen assoziiert. Bei Schilddrüsenadenomen liegt in ca. 9 % der Fälle eine Translokation unter Beteiligung der Bande 19q13.4 vor (Belge et al., 1998; Belge et al., 2001). Rippe et al. (2010) zeigten, dass diese Translokation in Schilddrüsenzelllinien und primären Schilddrüsenadenomen die Aktivierung der Cluster C19MC und miR-371-3 bewirkt.

In ETMR (*embryonal tumours with multilayered rosettes*), hochaggressiven pädiatrischen Gehirntumoren, bedingt eine Amplifikation innerhalb der

Chromosomenbande 19q13.4 die Überexpression von C19MC und miR-371-3 (Li et al., 2009; Pfister et al., 2009; Korshunov et al., 2013). Eine spätere Untersuchung zeigte, dass in diesen Tumoren außerdem ein Fusionsgen aus C19MC mit *TTYH1* vorliegt und die Expression von C19MC vom *TTYH1*-Promotor angetrieben wird (Kleinman et al., 2014). Für miR-520g-3p und miR-517c-3p wurde an Zelllinien demonstriert, dass sie den Zellen Wachstumsvorteile verleihen sowie die Differenzierung der Zellen hemmen und so einen Stammzell- bzw. Vorläuferzell-Phänotyp konservieren (Li et al., 2009).

Das Cluster C19MC ist auch in einigen hepatozellulären Karzinomen überexprimiert, wobei dies in manchen Fällen auf eine Amplifikation des C19MC-Locus, in anderen Fällen auf eine Hypomethylierung der zugehörigen CpG-Insel zurückzuführen ist (Toffanin et al., 2011; Augello et al., 2012; Fornari et al., 2012). Es wurde gezeigt, dass miR-517a-3p und miR-520c-3p die Proliferation sowie die Invasions- und Migrationsfähigkeit fördern (Toffanin et al., 2011). miR-519d-3p fördert ebenfalls Proliferation und Invasion und hemmt zusätzlich die Apoptose (Fornari et al., 2012). Die Amplifikation und die dadurch bedingte Überexpression von C19MC wurde auch in Nebenschilddrüsenkarzinomen und einigen -adenomen beschrieben (Vaira et al., 2012). In mesenchymalen Leberhamartomen kommt es bedingt durch eine Translokation oder auch durch paternale uniparentale Disomie zu einer Überexpression von C19MC (Kapur et al., 2014).

In testikulären Keimzelltumoren (*testicular germ cell tumours* (TGCTs)) ist das Cluster miR-371-3 hochreguliert (Gillis et al., 2007; Murray et al., 2010; Palmer et al., 2010; Bing et al., 2012; Dieckmann et al., 2012; Novotny et al., 2012). Für miR-372-3p und miR-373-3p wurde gezeigt, dass diese die Expression von *LATS2* unterdrücken. *LATS2* ist ein Tumorsuppressorgen, das den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus hemmt, indem es die Kinase-Aktivität von CyclinE/CDK2 herunterreguliert (Li et al., 2003) und das durch die Herunterregulation von Apoptose-Inhibitoren wie Bcl-2 und Bcl-xL Apoptose induziert (Ke et al., 2004). miR-372-3p und miR-373-3p verleihen den Zellen dadurch die Fähigkeit, trotz intaktem TP53-Signalweg, RAS-induziertem onkogenem Stress zu entgehen und weiterhin zu proliferieren (Voorhoeve et al., 2006). Die miRNAs von miR-371-3 lassen sich zudem in Serumproben von Hodenkrebspatienten detektieren und scheinen vielversprechende Kandidaten als Tumormarker für Hodenkrebs zu sein (Murray et al., 2011; Belge et al., 2012; Dieckmann et al., 2012; Murray und

Coleman, 2012; Gillis et al., 2013; Rijlaarsdam et al., 2015; Spiekermann et al., 2015; Syring et al., 2015). Auch in undifferenzierten Hepatoblastomen wird miR-371-3 überexprimiert, wobei offenbar ein positiver Feedback-Loop zwischen miR-371-3 und dem Transkriptionsfaktor MYC besteht (Cairo et al., 2010).

Für miR-372-3p, -515-3p, -519b-3p, -519d-3p, -519e-3p, -520a-3p, -520b und -520h wurde nachgewiesen, dass sie die Proliferation steigern, indem sie *CDKN1A* (p21) herunterregulieren und somit den p21-vermittelten Zellzyklusarrest aufheben (Qi et al., 2009; Wu et al., 2010). In einer anderen Studie verliehen die miRNAs miR-372-3p, -373-3p, -512-3p, -515-3p, -519c-3p, -519d-3p, -519e-3p, -520a-3p, -520b, -520c-3p, -520d-3p, -520e, -520f-3p, -520g-3p und -526b-3p den untersuchten Zellen die Fähigkeit, einer onkogen-induzierten Seneszenz zu entgehen, vermutlich ebenfalls über die Herunterregulation von *CDKN1A* (Borgdorff et al., 2010). Die miRNAs miR-373-3p und miR-520c-3p verliehen der Brustkrebszelllinie MCF-7 durch die Herunterregulation von *CD44* migratorische und invasive Fähigkeiten (Huang et al., 2008). Zhou et al. (2012a) zeigten, dass miR-372-3p und miR-373-3p den WNT-β-Catenin-Signalweg aktivieren, indem sie die Expression von *DKK1*, eines Antagonisten dieses Signalwegs, inhibieren. Der Wnt-β-Catenin-Signalweg spielt bei der Aufrechterhaltung von Stammzelleigenschaften eine Rolle und ist in diversen Tumoren aktiviert. Die Transkription von miR-372-3p und miR-373-3p wird wiederum durch β-Catenin/LEF1 aktiviert, wodurch ein positiver Feedback-Loop zur Aktivierung des WNT-β-Catenin-Signalwegs entsteht.

Für miRNAs der beiden Cluster wurden auch tumorsuppressive Eigenschaften nachgewiesen. Keklikoglou et al. (2011) konnten für miR-372-3p, -373-3p, -520c-3p und -520e zeigen, dass diese miRNAs die Invasivität der untersuchten Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 reduzieren, indem sie einen hemmenden Einfluss auf den NF-κB- und den TGF-β-Signalweg ausüben. Beide Signalwege sind bei Brustkrebs an Tumorentstehung und Metastasierung beteiligt (Imamura et al., 2012; Zubair und Frieri, 2013). Ihre Wirkung entfalten die genannten miRNAs, indem sie die Expression von *RELA* (*p65*), einem am NF-κB-Signalweg beteiligten Transkriptionsfaktor, und von *TGFBR2*, einem Rezeptor, der die Aktivierung des TGF-β-Signalwegs induziert, negativ regulieren (Keklikoglou et al., 2011). Auch miR-519d-3p hat einen hemmenden Einfluss auf den TGF-β-Signalweg und damit auf Zellproliferation und -migration (Gennarino et al., 2012). Die miRNAs miR-519a-3p, -519b-3p und -519c-3p hemmen die Expression von *ELAVL1 (HuR)*

(Abdelmohsen et al., 2008). Bei ELAVL1 handelt es sich um ein RNA-bindendes Protein, welches ubiquitär exprimiert wird. Es stabilisiert und moduliert die Translation von Zielgenen, von denen viele eine anti-apoptotische Wirkung oder einen stimulierenden Einfluss auf Zellteilung, Angiogenese und Invasion haben (Hinman und Lou, 2008). Durch die Herunterregulation von ELAVL1 üben miR-519a-3p, -519b-3p und -519c-3p eine hemmende Wirkung auf die Proliferation (Abdelmohsen et al., 2008) sowie das Tumorwachstum *in vivo* (Abdelmohsen et al., 2010) aus und induzieren Seneszenz (Marasa et al., 2010). Yu et al. (2015) zeigten, dass miR-520a-3p in nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC) unterexprimiert ist und demonstrierten, dass miR-520a-3p den MAP-Kinase-Signalweg hemmt, indem sie *MAP3K2* (*MEKK2*) herunterreguliert. Dies resultierte in einer verringerten Proliferation, Invasion und Migration sowie vermehrter Apoptose der untersuchten Zellen. Außerdem wurde *in vivo* ein verringertes Tumorwachstum festgestellt. Über die hier genannten Publikationen hinaus gibt es noch eine große Anzahl weiterer Untersuchungen, in denen die Über- oder Unterexpression einzelner C19MC und miR-371-3 miRNAs bzw. deren onkogene oder tumorsuppressive Eigenschaften demonstriert wurden.

Die miRNAs von C19MC und miR-371-3 sind demnach in vielfältiger und komplexer Weise an der Entstehung von Tumoren beteiligt, während sie ihre physiologische Funktion in embryonalen Stammzellen und in der Plazenta ausüben. Um die beiden Cluster näher zu charakterisieren, sollte in der vorliegenden Arbeit die Expression und Regulation von C19MC und miR-371-3 in malignen Schilddrüsentumoren und testikulären Keimzelltumoren sowie in der Plazenta näher untersucht werden. Dazu wurden Expressions- und Methylierungsanalysen durchgeführt. Ein weiterer Aspekt war die Überprüfung der Eignung von C19MC-miRNAs als Serum-Biomarker für Hodenkrebs.

2 Material und Methoden

2.1 Gewebeproben

Die Formalin fixierten, Paraffin eingebetteten (FFPE)-Schilddrüsenkarzinome (Publikation I) stammten vom Institut für Pathologie des Klinikum Bremen-Mitte.
Die FFPE-Hodentumorgewebe und FFPE-Hodennormalgewebe (Publikation II) wurden von der Pathologie des Albertinen-Krankenhauses Hamburg, die Serumproben von der Urologie des Albertinen-Krankenhauses Hamburg zur Verfügung gestellt.
Die FFPE-Gewebeproben von Endometrium, Duodenum und Schilddrüse (Publikation II) wurden vom Institut für Pathologie des Elbe-Klinikums Stade zur Verfügung gestellt.
Die Chorionzottenzellen (Publikation IV) stammten aus der Praxis für Pränatalmedizin am Klinikum Links der Weser. Zur Durchführung der Pränataldiagnostik wurden Langzeit-Zellkulturen nach Routineverfahren angelegt. Überschüssiges Zellmaterial wurde mit schriftlichem Einverständnis der Patientinnen zur Durchführung der Studie zur Verfügung gestellt.
Die Gewebeproben der reifen Plazenta und der dazugehörigen chorioamniotischen Membran (Publikation IV) wurden von der Frauenklinik des Krankenhauses Cuxhaven mit schriftlichem Einverständnis der Patientinnen zur Verfügung gestellt. Die Gewebeproben wurden nach der Entbindung entnommen. Ein Stück wurde zum anschließenden Anlegen einer Zellkultur in Hanks-Lösung überführt. Jeweils ein weiteres (ca. 1 cm^3 großes) Stück wurde in 4%iger Formaldehyd-Lösung (Formalin) fixiert. Die in Formalin fixierten Proben wurden anschließend nach Standardverfahren im Institut für Pathologie des Elbe-Klinikums Stade in Paraffin eingebettet.
Die Gewebeproben der Schilddrüsenadenome (Publikation IV) wurden von der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Krankenhauses St. Joseph-Stift Bremen zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden den Patienten während einer Schilddrüsenresektion entnommen, direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei −80°C gelagert.
Die Verwendung sämtlicher Proben geschah im Einklang mit der Deklaration von Helsinki (*Declaration of Helsinki*, 2013) und wurde durch eine Ethik-Kommission genehmigt sowie gegebenenfalls eine schriftliche Einverständniserklärung der Patienten eingeholt.

2.2 Zellkultur

Die Zellkulturen von Chorionzottenbiopsien und reifer Plazenta (Publikation IV) wurden nach Standardverfahren zur Gewinnung mesenchymaler Stamm-/Stromazellen (MSCs) angesetzt.

2.3 miRNA-Expressionsanalyse

2.3.1 RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung aus FFPE-Proben wurden 3–8 Schnitte à 5 µm Dicke angefertigt. Die Isolierung erfolgte entweder mit dem High Pure RNA Paraffin Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) (Publikation I) oder mit dem innuPREP MicroRNA Kit (Analytik Jena AG, Jena) (Publikationen II und IV). Die Herstellerprotokolle wurden jeweils für die Gewinnung auch kleiner RNAs bzw. für die Anwendung bei FFPE-Proben modifiziert.
Die RNA-Isolierung aus tiefgefrorenen Geweben sowie aus Zellkulturproben (Publikation IV) wurde mit dem miRNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden) entsprechend den Herstellerangaben inklusive DNase-Verdau durchgeführt. RNA aus Serumproben (Publikation II) wurde ebenfalls mit dem miRNeasy Mini Kit isoliert, allerdings mit kleinen Modifikationen und ohne DNase-Verdau.

2.3.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese für die verwendeten Gewebe- und Zellkulturproben (Publikationen I, II und IV) wurde mit dem TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Darmstadt) unter Verwendung miRNA-spezifischer Stem-loop-Primer (enthalten in den jeweiligen TaqMan microRNA Assays (Life Technologies)) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurde für jede zu messende miRNA sowie die endogene Kontrolle RNU6B jeweils ein einzelner cDNA-Ansatz hergestellt. Es wurden jeweils 200 ng RNA eingesetzt.
Die cDNA-Synthese für Serumproben (Publikation II) erfolgte ebenfalls mit dem TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) unter Verwendung miRNA-spezifischer Stem-loop-Primer. Allerdings wurde in diesem Fall ein Primerpool verwendet, der cDNA-Ansatz enthielt somit jeweils 1 µl des Stem-loop-Primers der zu untersuchenden miRNA und der endogenen Kontrolle miR-93-5p, so

dass pro Probe nur ein cDNA-Ansatz hergestellt wurde. Aufgrund der geringen RNA-Konzentrationen der Serumproben wurde auf eine Quantifizierung der RNA verzichtet und 6 µl RNA in die cDNA-Synthese eingesetzt.

2.3.3 Präamplifizierung

Aufgrund der geringen RNA-Menge in Serum, wurde für die Serumproben (Publikation II) vor der eigentlichen Quantifizierung eine Präamplifizierung durchgeführt. Die Präamplifizierungs-Reaktion wurde mit dem 5x Real Time ready cDNA Pre-Amp Master (Roche Diagnostics, Mannheim) und den TaqMan MicroRNA Assays (Life Technologies, Darmstadt) durchgeführt. Die Reaktion bestand aus 4 µl cDNA, jeweils 1,12 µl Assay (1:100 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt) der zu messenden miRNA sowie der endogenen Kontrolle, 4 µl 5x Real Time ready cDNA Pre-Amp Master (Roche) und Nuklease-freiem Wasser, so dass sich ein Gesamtvolumen von 20 µl ergab. Die Präamplifizierung wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 1 min bei 95 °C, anschließend 14 Zyklen bei 15 s bei 95 °C und 4 min bei 60 °C.

2.3.4 Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR für Gewebe- und Zellkulturproben (Publikationen I, II und IV) wurde unter Verwendung des TaqMan Universal PCR Master Mix (2x) (Life Technologies, Darmstadt) sowie der TaqMan microRNA Assays (Life Technologies) auf einem 7300 Real-Time PCR System (Life Technologies) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels der „7300 System Sequence Detection Software“ (Version 1.2.3) (Life Technologies).

Die qRT-PCR der Serumproben (Publikation II) erfolgte mit dem FASTstart Universal Probe Master (Roche Diagnostics, Mannheim) und den TaqMan microRNA Assays (Life Technologies) nach vorhergehender Präamplifizierung. Das Produkt der Präamplifizierung wurde 1:2 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und 5 µl davon in die qRT-PCR-Reaktion eingesetzt. Die qRT-PCR-Reaktion bestand aus 10 µl FASTstart Universal Probe Master (Roche), 1 µl des jeweiligen Assays sowie Nuklease-freiem Wasser für ein Gesamtvolumen von 20 µl. Die Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen auf einem 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies) durchgeführt: 10 min bei 95°C, anschließend 40 Zyklen von 15 s bei

95°C und 1 min bei 60°C. Die Auswertung erfolgte mittels der „7500 Software“ (Version 2.0.6) (Life Technologies).

Alle Proben wurden im Triplikat gemessen sowie stets Negativkontrollen ohne Template bzw. ohne Reverse Transkriptase mitgeführt. Die relative Genexpression wurde gemäß der ΔΔCt-Methode nach Livak und Schmittgen (2001) berechnet.

2.4 DNA-Methylierungsanalyse

2.4.1 DNA-Isolierung

DNA wurde aus Chorionzotten-Zellkulturen (Publikation IV) mittels des QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden) unter Einhaltung des Herstellerprotokolls isoliert.

2.4.2 Bisulfit-Konvertierung

2000 ng DNA wurden in eine Bisulfit-Konvertierungsreaktion eingesetzt, bei der unmethylierte Cytosine in CpG-Stellen chemisch in Uracil umgewandelt werden, methylierte Cytosine jedoch unverändert bleiben. Dies wurde mit Hilfe des EZ DNA Methylation Gold Kit (Zymo Research, Irvine, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation eines 381 bp langen Abschnitts der C19MC-CpG-Insel wurde eine PCR mit der ZymoTaq DNA Polymerase (Zymo Research) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 10 min bei 95 °C, anschließend 35 Zyklen von 30 s bei 95 °C, 30 s bei 51 °C und 30 s bei 72 °C, schließlich 7 min bei 72 °C. Als Primer wurden AAGGTTGGTTTTTTTATTTGTAAA (forward primer) und ACAAATTCTAATCCCTCAAAAA (reverse primer) (biomers, Ulm) verwendet.

2.4.4 Klonierung und Sequenzierung

Das PCR-Produkt wurde nach Herstellerangaben in den pGEM-T Easy Vektor (Promega, Mannheim) ligiert. Die Transformation wurde mittels Elektroporation durchgeführt. Dafür wurde das Ligationsprodukt zunächst mittels des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt, um Salze zu entfernen, die die Elektroporation behindern. Für die Transformation wurden 40 µl elektrokompetente

E. coli JM109 Bakterien (7,5 * 10^9 Zellen) mit 2 µl aufgereinigtem Ligationsprodukt in eine Küvette gegeben und im *E. coli* Pulser (Biorad, München) für 5 ms einer Spannung von 2,5 kV ausgesetzt. Anschließend wurde 1 ml SOC-Medium zum Ansatz gegeben und dieser 1 h bei 37°C und 500 - 600 rpm inkubiert. Nach Ausplattierung auf LB-AIX-Platten und Inkubation über Nacht bei 37°C erfolgte die Auswahl geeigneter Klone mittels Blue-White-Screening. Von den 20 ausgewählten Klonen wurde eine Übernachtkultur angesetzt. Die Isolierung der DNA aus den Übernachtkulturen erfolgte mittels des QIAPrep Miniprep Kits (QIAGEN) nach Herstellerangaben. Die Sequenzierung der Klone wurde von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) unter Verwendung des Primers T7 durchgeführt.

2.5 Demethylierung mittels 5-Aza-2′-desoxycytidin

Zur Demethylierung der CpG-Insel wurde eine Chorionzotten-Zellkultur (Publikation IV) mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-2′-desoxycytidin (5-Aza-dC) behandelt, der die Methylierung des neusynthetisierten Stranges nach einer Zellteilung verhindert. Dazu wurde 5-Aza-dC in einer Endkonzentration von 2,5 M ins Zellkulturmedium gegeben und die Zellen 72 h wachsen gelassen. Eine unbehandelte Zellkultur diente als Kontrolle.

3 Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die im Rahmen dieser Dissertation verfassten Artikel vorgestellt. Die experimentellen Ergebnisse werden in den Publikationen I, II und IV dargelegt. Bei den beiden weiteren Publikationen handelt es sich um einen Review-Artikel über C19MC in Form eines „Invited Commentary“ zu Fornari et al. (2012) (Publikation III) sowie um eine Hypothese zur Funktion von C19MC (Publikation V).

3.1 Publikation I: Activation of the two microRNA clusters C19MC and miR-371-3 does not play prominent role in thyroid cancer (Rippe, Flor et al., 2012)

Die Tumoren der Schilddrüse werden in epitheliale und nicht-epitheliale Tumoren unterteilt, wobei nicht-epitheliale Schilddrüsentumoren äußerst selten sind (Schmid et al., 2003). 80–90 % der epithelialen Schilddrüsentumoren sind benigne Tumoren, bei denen es sich wiederum zu fast 100 % um follikuläre Adenome handelt. Maligne Schilddrüsentumoren machen dementsprechend ca. 10–20 % der epithelialen Schilddrüsentumoren aus (Perren et al., 2008). An ihnen erkranken in Deutschland jährlich ca. 4200 Frauen und 1700 Männer (Stand: 2010) (*Krebs in Deutschland 2009/2010*, 2013). Die WHO unterteilt sie in follikuläre (FTC), papilläre (PTC), gering differenzierte (PDTC), anaplastische (ATC) und medulläre (MTC) Schilddrüsenkarzinome (De Dellis et al., 2004). Bei FTC und PTC handelt es sich um differenzierte, bei ATC um undifferenzierte Tumoren (Schmid et al., 2003). FTC, PTC, PDTC und ATC gehen aus den Follikelepithelzellen (Thyreozyten) hervor, welche die Schilddrüsenhormone Thyroxin (T_4) und Trijodthyronin (T_3) produzieren und sezernieren, MTC dagegen aus den parafollikulären C-Zellen, die das Hormon Calcitonin produzieren (Welsch, 2010; Nikiforov und Ohori, 2012). Eine Untergruppe des FTC ist das onkozytäre Schilddrüsenkarzinom (auch Hürthle-Zell-Karzinom oder oxyphiles Karzinom genannt), welches allerdings von einigen Autoren auch als separate Entität angesehen wird (Nikiforov, 2012).

Ca. 45 % der Schilddrüsenadenome weisen chromosomale Aberrationen auf, in ca. 21 % dieser Fälle handelt es sich dabei um eine Translokation im Bereich der Bande 19q13.4 (Belge et al., 1998; Belge et al., 2001). Diese Translokation bewirkt die Aktivierung der dort lokalisierten miRNA-Cluster C19MC und miR-371-3 (Rippe et al.,

2010). Es wurde daher eine Beteiligung dieser miRNAs an der Tumorgenese von Schilddrüsenadenomen vermutet. miRNAs beider Cluster wurden bereits mit tumorigenen Wirkungen wie z.B. der Steigerung der Proliferation (Voorhoeve et al., 2006; Lee et al., 2009; Li et al., 2009; Qi et al., 2009; Wu et al., 2010; Toffanin et al., 2011; Wu et al., 2011; Fornari et al., 2012; Yamashita et al., 2012; Zhou et al., 2012a; Zhou et al., 2012b) oder der Invasions- und Migrationsfähigkeit (Huang et al., 2008; Yu et al., 2008; Yang et al., 2009; Cairo et al., 2010; Su et al., 2010; Toffanin et al., 2011; Yan et al., 2011; Fornari et al., 2012; Liu und Wilson, 2012; Zhou et al., 2012a; Pang et al., 2014; Tay et al., 2014; Kan et al., 2015; Yang et al., 2015; Zhang et al., 2015) in Verbindung gebracht. Da die beiden letztgenannten Eigenschaften nur malignen Tumoren zu Eigen sind, warf dies die Frage auf, ob die translokationsbedingte Aktivierung von C19MC und miR-371-3 in follikulären Schilddrüsenzellen einen wichtigen Schritt bei der malignen Transformation darstellt und ob die Aktivierung dieser Cluster Schilddrüsenadenome zur malignen Transformation prädisponiert. Sollte dies der Fall sein, so wäre zu erwarten, dass auch bei Schilddrüsenkarzinomen Fälle von erhöhter C19MC- und miR-371-3-Expression auftreten.

Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Publikation insgesamt 114 maligne Schilddrüsentumoren unterschiedlicher Histologie (papilläre Karzinome (n = 78), follikuläre Karzinome (n = 25), anaplastische Karzinome (n = 8), medulläre Karzinome (n = 2), onkozytäres Karzinom (n = 1)) untersucht. Zunächst erfolgte die Messung von miR-372-3p mittels qRT-PCR. Als Kontrollen dienten normales Schilddrüsengewebe sowie eine Probe eines Schilddrüsenadenoms mit nachgewiesener 19q13.4-Translokation als Positivkontrolle. In den Schilddrüsenkarzinomen konnte eine erhöhte Expression über bzw. etwa auf dem Niveau der Positivkontrolle nur in zwei Fällen (KS 13 (PTC) und KS 100 (ATC)) festgestellt werden. Zur Kontrolle, ob diese Expression tumorspezifisch ist, wurde anschließend von diesen beiden Proben Normalgewebe aus der Umgebung des Tumors untersucht. Die Überexpression von miR-372-3p konnte ausschließlich im Tumorgewebe festgestellt werden. Um die Ergebnisse weiter abzusichern, wurde in KS 13 und KS 100 sowie jeweils einer Tumorprobe der häufigsten histologischen Untergruppen von Schilddrüsenkarzinomen (papilläres Karzinom, follikuläres Karzinom, anaplastisches Karzinom und medulläres Karzinom) zusätzlich miR-371a-3p gemessen. Die Ergebnisse entsprachen denen für miR-372-3p: es

wurde eine ähnliche oder sogar deutlich höhere Expression in den Proben KS 100 und KS 13 im Vergleich zur Positivkontrolle festgestellt, in den anderen Proben jedoch eine Expression auf Niveau des Schilddrüsennormalgewebes.

Anschließend wurde die Expression des Cluster C19MC untersucht. Dazu wurde in allen 114 Proben miR-520c-3p gemessen sowie zusätzlich miR-519a-3p in denjenigen Proben, in denen bereits miR-371a-3p gemessen worden war. Eine Überexpression konnte in keiner der Tumoren nachgewiesen werden, die Expressionslevel bewegten sich im Bereich des normalen Schilddrüsengewebes, lediglich KS 13 und KS 100 zeigten im Vergleich zum Normalgewebe für miR-519a-3p leicht erhöhte Expressionslevel, welche jedoch weit unter denen der Positivkontrolle lagen.

Um zu überprüfen, ob die beiden Proben KS 13 und KS 100 eine 19q13.4-Translokation aufweisen, wurden sie mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) unter Nutzung einer *dual-color-break apart-rearrangement*-Sonde (TBPC19; *thyroid adenoma breakpoint cluster* 19q13.4), welche die Bruchpunktregion abdeckt, untersucht. In keinem der beiden Tumoren konnte eine 19q13.4-Translokation festgestellt werden.

Die Tatsache, dass in keinem der untersuchten Schilddrüsenkarzinome eine erhöhte Expression von C19MC- und miR-371-3-miRNAs auf dem Niveau der von der Translokation betroffenen Schilddrüsenadenome festgestellt wurde, spricht dafür, dass die Expression in Schilddrüsenepithelzellen bzw. -adenomen keine Prädisposition für maligne Entartung darstellt und die miRNAs in diesem zellulären Kontext offenbar keine malignen Eigenschaften verleihen.

I

Activation of the two microRNA clusters C19MC and miR-371-3 does not play prominent role in thyroid cancer

Volkhard Rippe*, Inga Flor*, Johannes Wolfram Debler, Norbert Drieschner, Birgit Rommel, Daniel Krause, Klaus Junker, Jörn Bullerdiek

*diese Autoren sind gleichberechtigte Erstautoren des Artikels

Molecular Cytogenetics ***5****: 40*

Eigenanteil

- Durchführung der RNA-Isolierung und cDNA-Synthese sowie der qRT-PCR und deren Auswertung zusammen mit J. W. Debler
- Planung der Studie zusammen mit J. W. Debler, V. Rippe und J. Bullerdiek
- Verfassen des Manuskripts zusammen mit J. Bullerdiek

Rippe et al. Molecular Cytogenetics 2012, 5:40
http://www.molecularcytogenetics.org/content/5/1/40

MOLECULAR CYTOGENETICS

RESEARCH Open Access

Activation of the two microRNA clusters C19MC and miR-371-3 does not play prominent role in thyroid cancer

Volkhard Rippe[1†], Inga Flor[1†], Johannes Wolfram Debler[1], Norbert Drieschner[1], Birgit Rommel[1], Daniel Krause[2], Klaus Junker[2] and Jörn Bullerdiek[1*]

Abstract

Chromosomal rearrangements of band 19q13.4 are frequent cytogenetic alterations in benign thyroid adenomas. Apparently, these alterations lead to the upregulation of genes encoding microRNAs of two clusters mapping to the breakpoint region, i.e. miR-371-3 and C19MC. Since members of both clusters have been associated with neoplastic growth in other tumor entities the question arises whether or not their upregulation predisposes to malignant transformation of follicular cells of the thyroid. To address this question we have quantified the expression of miR-372 and miR-520c-3p in samples of 114 thyroid cancers including eight anaplastic thyroid carcinomas, 25 follicular thyroid carcinomas, 78 papillary thyroid carcinomas (including 13 follicular variants thereof), two medullary thyroid carcinomas and one oncocytic thyroid carcinoma. Additionally, we quantified miR-371a-3p and miR-519a-3p in selected samples. While in neither of the cases miR-520c-3p and miR-519a-3p were found to be upregulated, one papillary and one anaplastic thyroid carcinoma, respectively, showed upregulation of miR-372 and miR-371a-3p. However, in these cases fluorescence in situ hybridization did not reveal rearrangements of the common breakpoint region as affected in adenomas. Thus, these rearrangements do apparently not play a major role as first steps in malignant transformation of the thyroid epithelium. Moreover, there is no evidence that 19q13.4 rearrangements characterize a subgroup of thyroid adenomas associated with a higher risk to undergo malignant transformation. Vice versa, the mechanisms by which 19q13.4 rearrangements contribute to benign tumorigenesis in the thyroid remain to be elucidated.

Keywords: Thyroid tumors, microRNAs, C19MC, miR-371-3

Background

MicroRNAs (miRNAs) are short non protein-coding RNA molecules that negatively regulate gene expression by binding to the 3' UTR of mRNA thereby inhibiting its transcription or promoting nucleolytic cleavage. Abnormal expression patterns of miRNAs have been found in many types of tumors and, as to malignant tumors, are able to promote cancer specific properties like metastasis, angiogenesis or proliferation [1,2].

We have been able to show that the most frequent recurrent chromosomal rearrangement in benign thyroid tumors, i.e. translocations of chromosomal band 19q13, initially described more than 20 years ago [3], clusters within a 150 kb region assigned to 19q13.4 [4]. More recently, we have demonstrated that these aberrations target the two miRNA gene clusters C19MC (chromosome 19 microRNA cluster) and miR-371-3 resulting in their transcriptional activation likely due to juxtaposing them to transcriptional activators [5] or by removal of CpG rich regions [6] upstream of the clusters.

Normally, the expression of miRNAs of both clusters is abundant in embryonic stem cells (ESC) [7-12] and later becomes repressed in the embryo whereas expression of both clusters persists in the placenta until birth

* Correspondence: bullerd@uni-bremen.de
†Equal contributors
[1]Center for Human Genetics, University of Bremen, Leobener Str. ZHG, 28359, Bremen, Germany
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2012 Rippe et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

[13,14]. Transcriptional activity of C19MC results from the paternal allele only because the maternal allele is silenced by methylation [15]. However, the biological function of these miRNAs for the placenta development is not yet understood. In a recent set of interesting papers on miRNAs from the miR-371-3 cluster in tumors, their overexpression has been correlated with an invasive cellular behavior [16-19]. On the other hand, miRNAs of C19MC have been described to have oncogenic as well as tumorsuppressive characteristics [for summary see [20]].

Nevertheless, it has not yet been tested if, akin to adenomas with 19q13.4 rearrangements, subsets of thyroid carcinomas also overexpress the genes of both clusters which may indicate that those malignant tumors are derived from pre-existing benign lesions. We therefore examined 114 formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor samples of the major histological groups of thyroid cancer for their expression of miR-372 and miR-520c-3p, respectively. Selected samples were also analyzed for their expression of miR-371a-3p and miR-519a-3p. We found no cases expressing both miRNAs within the range observed in adenomas with 19q13.4 rearrangements. Interestingly though, two tumors expressed miR-372 and miR-371a-3p at a comparable level.

Results

By quantitative real-time PCR we first measured miR-372 levels in 114 thyroid carcinomas of different histological groups. Our samples included eight anaplastic thyroid carcinomas (ATC), 25 follicular thyroid carcinomas (FTC), 78 papillary thyroid carcinomas (PTC), including 13 follicular variants of PTC, two medullary thyroid carcinomas (MTC) and one oncocytic thyroid carcinoma (OTC). As a subgroup of thyroid adenomas is shown to overexpress both clusters due to chromosomal rearrangements involving chromosomal band 19q13.4 [5] we used a thyroid adenoma sample (S1016) of this subgroup as a positive control for quantification of miR-372, respectively.

Compared to normal thyroid tissue miR-372 was clearly upregulated in only two tumors (KS 13 and KS 100) (2.4%) (Figure 1A). KS 13 is a follicular variant of a PTC and KS 100 is an ATC (Figure 1B, C).

In order to validate that overexpression of miR-372 is indeed tumor-specific we used another FFPE block of case KS 13 to separate the surrounding tissue from the tumor. Overexpression of miR-372 was clearly confined to the tumor and absent in the surrounding normal thyroid tissue (Figure 2).

To further corroborate our results we next quantified another member of miR-371-3 (i.e. miR-371a-3p) in KS 13 and KS 100 and in one sample of each major histological subgroup (ATC, PTC, FTC), respectively. Akin to what was observed for miR-372, miR-371a-3p was upregulated in KS 13 and KS 100 with expression levels similar to or clearly exceeding that of the positive control S1016 whereas miR-371a-3p was not upregulated in the three other samples (Figure 3A).

We then focused on the cluster C19MC and quantified the expression of miR-520c-3p in all of the 114 thyroid carcinoma samples and miR-519a-3p in the same samples that were used to quantify miR-371a-3p. Neither miR-520c-3p nor miR-519a-3p were upregulated in any of the samples but expressed at a level comparable to that of the normal thyroid tissue; at most, a slight increase could be noted for miR-519a-3p in KS 13 and KS 100 which, however, did not reach levels comparable to that of the thyroid adenoma with 19q13.4 rearrangement (Figure 3B,C).

In order to check whether the two samples KS 100 and KS 13 showing an increased expression of miR-372 and miR-371a-3p harbor 19q13.4 rearrangements we performed fluorescence in situ hybridization (FISH) with a dual-color break-apart rearrangement probe covering the thyroid adenoma breakpoint cluster 19q13.4 (TBPC19) [4]. In none of the nuclei of either of the two cases or of the negative control signal patterns corresponding to 19q13.4 rearrangements were detected (Figure 4A,B). As a positive control cytologic smears of adenoma S1016 were used. In this case, FISH revealed 83.5% positive nuclei (one pair of colocalized signals, two separate signals) (Figure 4C). G-banding analysis of this case revealed an apparently balanced translocation t(2;19)(p13;q13.4) (Figure 4D).

Discussion

Whereas adenomas and goiters belong to highly prevalent lesions of the thyroid not only in iodine-deficient regions malignant thyroid tumors are rare. Both papillary and follicular carcinomas of the thyroid are supposed to originate from the thyroid epithelium. At least for the follicular carcinomas a possible continuum from thyroid adenomas to follicular carcinomas has been proposed [21]. This idea is at least supported by a particular subtype of follicular tumors i.e. those characterized by a PAX8-PPARγ fusion due to a chromosomal rearrangement between chromosomal bands 2q13 and 3p25. As witnessed by the results of several studies, this abnormality can be found in follicular adenomas as well as in carcinomas [22-24]. However, the question arises whether or not other genetic subtypes of thyroid adenomas may predispose to malignant transformation. Recently, we have been able to demonstrate that translocations of chromosomal band 19q13.4, a frequent genetic alteration in thyroid adenomas, activate two miRNA clusters on the long arm of chromosome 19 [5]. Of these, C19MC is the largest human miRNA cluster encoding 59 mature

Rippe et al. Molecular Cytogenetics 2012, 5:40
http://www.molecularcytogenetics.org/content/5/1/40

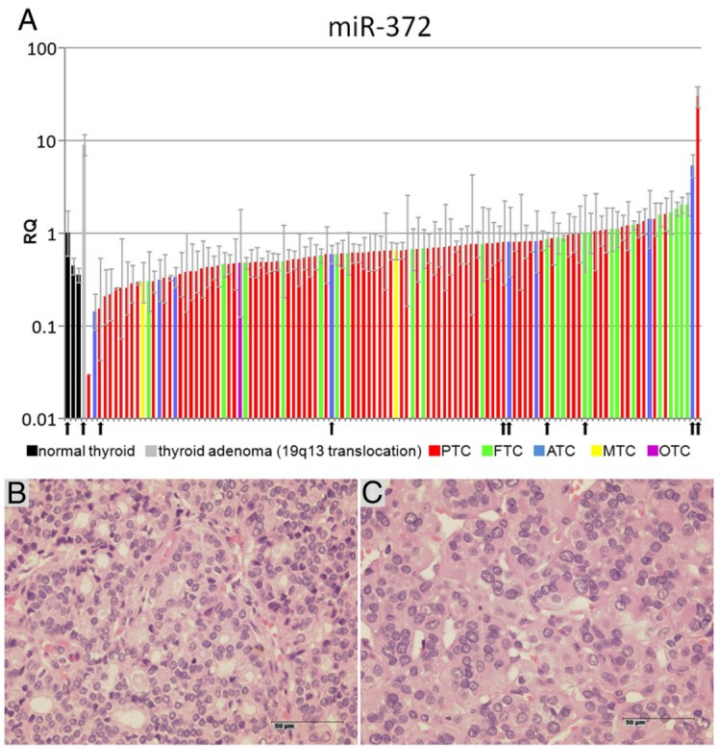

Figure 1 miR-372 was upregulated in 2 of 114 thyroid carcinomas. (**A**) Relative expression of miR-372 was quantified in 114 thyroid carcinoma samples of different types (PTC: papillary thyroid carcinoma, FTC: follicular thyroid carcinoma, ATC: anaplastic thyroid carcinoma, MTC: medullary thyroid carcinoma, OTC: oncocytic thyroid carcinoma). Expression is compared to three different normal thyroid tissues. The thyroid tissue showing the highest expression of miR-372 was used as calibrator. A thyroid adenoma with 19q13.4 rearrangement (S1016) served as a positive control of abundant miR-372 expression. The arrows indicate the samples that also appear in Figure 3 (from left to right: normal thyroid tissue, S1016, KS 99, KS 97, KS 61, KS 41, KS 82, KS 106, KS 100, KS 13). RQ: relative quantity (logarithmic scale). The lower panel shows histological sections of (**B**) case KS 13, a follicular variant of papillary thyroid carcinoma (PTC) and (**C**) case KS 100, an anaplastic thyroid carcinoma (ATC).

miRNAs [14,25]. The cluster is primate specific and its members are abundantly expressed in embryonic stem cells (ESC) and in the placenta where strong expression is even detectable at term. The cluster is apparently controlled by an adjacent CpG island [6]. Maternal methylation leads to an almost exclusive expression of the paternal allel which, however, also becomes epigenetically silenced in the embryoblast while the "original", i.e. ESC-like, methylation pattern persists in the placenta. Relatively little is known about the function of that cluster and putative targets of its miRNAs. Although different miRNAs of C19MC have been shown to promote proliferation, invasion and other oncogenic functions [16,26,27], some have also been linked to tumor suppressive properties [28-30]. Overall there are thus conflicting data as to the functions of C19MC miRNAs [for summary see [20]] that so far give no sufficient explanation as to how these miRNAs contribute to the development of thyroid adenomas.

The second cluster affected by the 19q13.4 translocation seen as recurrent clonal chromosomal abnormalities in thyroid adenomas is much smaller. miR-371-3 only encodes five miRNAs and has orthologues in most mammalian species. This cluster is also abundantly expressed in embryonic stem cells and its re-expression in malignant tumors has been associated with invasiveness in a couple of studies [16-19]. These latter findings led us to suggest that activation of this cluster in thyroid adenomas may predispose these lesions to malignant transformation. If this hypothesis holds true one would expect this cluster to be overexpressed in subgroups of thyroid carcinomas from thyroid follicular epithelium. Interestingly, of 114 malignant thyroid tumors no lesion displayed an expression pattern akin to that seen in thyroid adenomas with 19q13.4 translocations, i.e. the simultaneous overexpression of genes of both clusters. In contrast, two tumors were found to overexpress miR-372 and miR-371a-3p but did neither abundantly express miR-520c-3p and miR-519a-3p nor displayed 19q13.4 rearrangements after FISH using appropriate DNA probes.

There is little doubt that chromosomal translocations involving 19q13.4 are causally associated with the

Rippe et al. Molecular Cytogenetics 2012, 5:40
http://www.molecularcytogenetics.org/content/5/1/40

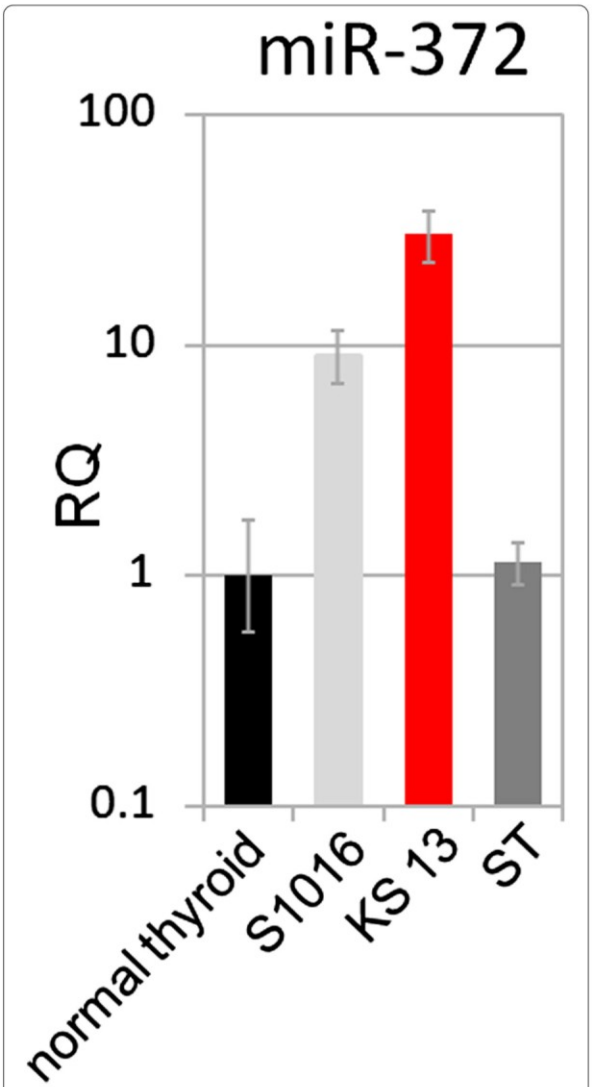

Figure 2 Relative expression of miR-372 in case KS 13 and surrounding normal tissue. Surrounding normal tissue (ST) was obtained from another FFPE block of the same sample. Expression is compared to normal thyroid tissue and a thyroid adenoma with 19q13.4 rearrangement (S1016) as positive control.

development of a subgroup of thyroid adenomas. Though highly recurrent, the mechanism by which they contribute to tumorigenesis is unknown. By these translocations involving varying translocation partners two gene clusters of miRNAs whose members have been associated with malignant growth are reactivated. Nevertheless, from the results of the present study as well as from data obtained on adenomas [5] no evidence exists that in thyroid tumors overexpression of both clusters resulting from 19q13.4 rearrangements characterizes lesions with the capability to invade surrounding tissue, i.e. to undergo malignant transformation. Thus, their function in adenomagenesis still remains to be elucidated.

Conclusion

Upregulation of the two miRNA clusters C19MC and miR-371-3 does not seem to characterize a major pathway of malignant transformation of the thyroid epithelium.

Methods

Tissues

FFPE tumor samples used for the analyses were retrieved from the archive of one of the authors (K. J.).

RNA isolation

RNA was isolated using the High Pure RNA Paraffin Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) as outlined below with modifications for the recovery of small RNAs according to Tang et al. [31].

100 μl tissue lysis buffer, 16 μl 10% SDS and 40 μl proteinase K were added to three 5 μm sections of FFPE tissue and the mixture was incubated for 15 min at 65°C and another 15 min at 80°C. After addition of 325 μl binding buffer the mixture was added to 350 μl absolute ethanol preliminarily put onto a High Pure filter tube. After centrifugation for 20 s at 8,000 × g the flow-through was discarded and the filter tube centrifuged again with the same conditions to dry the filter tube membrane. The membrane was then washed consecutively with 500 μl wash buffer I, 500 μl wash buffer II and 300 μl wash buffer II followed by centrifugation for 20 s at 8,000 × g, respectively, and a terminal centrifugation for 2 min at full speed to remove excess buffer. A mix consisting of 4 μl DNase, 6 μl 10x DNase buffer, and 50 μl aqua bidest was put onto the membrane and incubated for 30 min at 37°C. The DNase treatment was followed by another three wash steps with wash buffer I and II and centrifugations as described above. The RNA was then eluted by putting 50 μl elution buffer onto the membrane, incubating for 1 min and centrifuging for 1 min at 8,000 × g. RNA concentration was measured on a Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany).

Quantitative real-time PCR for detection of miR-372, miR-371a-3p, miR-520c-3p, and miR-519a-3p

Reverse transcription of miR-372, miR-371a-3p, miR-520c-3p, miR-519a-3p, and RNU6B (for normalization) was conducted using the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) according to the manufacturer´s instructions.

Real-time PCR was conducted on an ABI 7300 Real-time PCR system using TaqMan MicroRNA Assays (Life Technologies cat. no. 4427975; assay names hsa-miR-371-3p, hsa-miR-372, hsa-miR-520c-3p, hsa-miR-519, RNU6B)

Rippe *et al. Molecular Cytogenetics* 2012, **5**:40
http://www.molecularcytogenetics.org/content/5/1/40

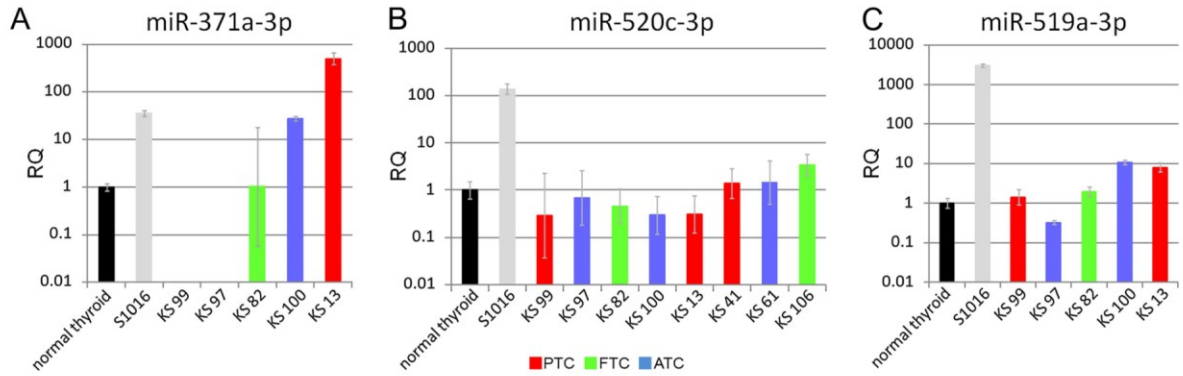

Figure 3 Relative expression of miR-371a-3p, miR-520c-3p, and miR-519a-3p in thyroid carcinoma samples. (**A**) Relative expression of miR-371a-3p was quantified in five thyroid carcinoma samples of different histological subgroups. (**B**) Relative expression of miR-520c-3p was quantified in 114 thyroid carcinoma samples of different types (as no upregulation was observed in any of the samples only a selection of samples is shown including the three cases with the highest expression of miR-520c-3p. (**C**) Relative expression of miR-519a-3p in five thyroid carcinoma samples of different types. In A,B and C the expression is compared to normal thyroid tissue and a thyroid adenoma with 19q13.4 rearrangement (S1016) as positive control. RQ: relative quantity (logarithmic scale). PTC: papillary thyroid carcinoma, FTC: follicular thyroid carcinoma, ATC: anaplastic thyroid carcinoma.

and the TaqMan Universal PCR Mastermix (Life Technologies) according to the manufacturer´s instructions.

Fluorescence in situ hybridization

To detect or exclude rearrangements of 19q13.4, cases with elevated expression were further analyzed by FISH using a dual-color, break-apart probe of the thyroid breakpoint cluster 19q13.4 (TBPC19) (PanPath, Budel, Netherlands) on FFPE tissue sections as described previously [32]. For pretreatment of 4 μm tissue sections digestion with a pepsin ready-to-use solution (DCS, Hamburg, Germany) was performed at 37°C for 2 × 45 min (case KS 100) and 1 × 30 min (case KS 13), respectively.

Images were captured with a high performance CCD-camera (Visitron Systems, Puchheim, Germany) and edited with FISH View (Applied Spectral Imaging, Migdal HaEmek, Israel). 200 non-overlapping nuclei from at least four different areas of the tumor were scored. As a control 100 non-overlapping nuclei from non-neoplastic

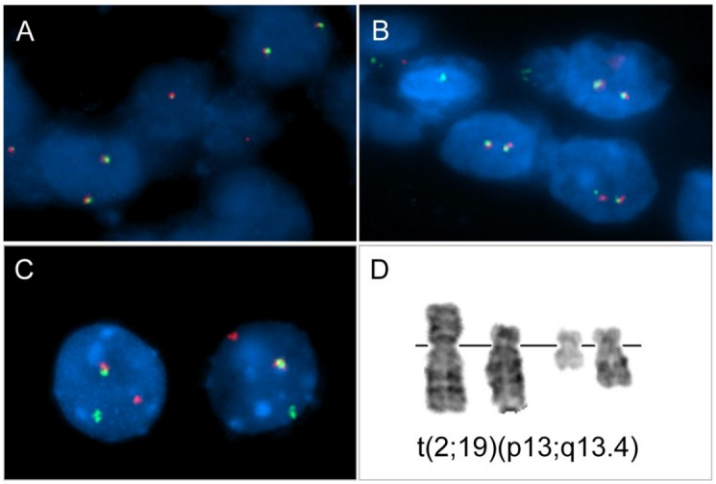

Figure 4 Fluorescence in situ hybridization for the detection of 19q13.4 rearrangements. Interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) was carried out with a dual-color break-apart rearrangement probe (TBPC19; thyroid adenoma breakpoint cluster 19q13.4) for nuclei of cases KS 13 (**A**), KS 100 (**B**), and the positive control S1016 (**C**), respectively. In addition, a partial karyotype of the latter case with an apparently balanced translocation t(2;19)(p13;q13.4) is shown (**D**).

thyroid tissue outside the tumor area of case KS 100 were scored. Two fusion signals indicate a non-rearranged thyroid breakpoint cluster 19q13.4, whereas one fusion signal along with a single green and a single red signal indicate a rearrangement of the thyroid breakpoint cluster 19q13.4. As a positive control, FISH was performed on cytological smears of S1016 as described previously [33].

Abbreviations

ATC: Anaplastic thyroid carcinoma; C19MC: Chromosome 19 microRNA cluster; ESC: Embryonic stem cells; FFPE: Formalin-fixed, paraffin-embedded; FISH: Fluorescence in situ hybridization; FTC: Follicular thyroid carcinoma; miRNA: microRNA; MTC: Medullary thyroid carcinoma; OTC: Oncocytic thyroid carcinoma; PTC: Papillary thyroid carcinoma; RQ: Relative quantification; TBPC19: Thyroid adenoma breakpoint cluster 19q13.4 dual-color break-apart rearrangement probe.

Competing interests

No competing interests declared.

Authors' contributions

VR and JB designed the study and analyzed the data. IF and JB drafted the manuscript and analyzed the data. JWD and IF carried out the expression analyses. JWD analyzed the data and helped to draft the manuscript. ND carried out the fluorescence in situ hybridization. BR did the cytogenetic analyses. KJ and DK provided the samples and carried out the histological examinations. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

[1]Center for Human Genetics, University of Bremen, Leobener Str. ZHG, 28359, Bremen, Germany. [2]Department of Pathology, Hospital Bremen-Mitte, St.-Jürgen-Str. 1, 28177, Bremen, Germany.

Received: 25 April 2012 Accepted: 21 August 2012
Published: 15 October 2012

References

1. Bartel DP: **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell* 2004, **116:**281–297.
2. Li M, Li J, Ding X, He M, Cheng SY: **microRNA and cancer.** *AAPS J* 2010, **12:**309–317.
3. Bartnitzke S, Herrmann ME, Lobeck H, Zuschneid W, Neuhaus P, Bullerdiek J: **Cytogenetic findings on eight follicular thyroid adenomas including one with a t(10;19).** *Cancer Genet Cytogenet* 1989, **39:**65–68.
4. Belge G, Rippe V, Meiboom M, Drieschner N, Garcia E, Bullerdiek J: **Delineation of a 150-kb breakpoint cluster in benign thyroid tumors with 19q13.4 aberrations.** *Cytogenet Cell Genet* 2001, **93:**48–51.
5. Rippe V, Dittberner L, Lorenz VN, Drieschner N, Nimzyk R, Sendt W, Junker K, Belge G, Bullerdiek J: **The two stem cell microRNA gene clusters C19MC and miR-371-3 are activated by specific chromosomal rearrangements in a subgroup of thyroid adenomas.** *PLoS One* 2010, **5:**e9485.
6. Tsai KW, Kao HW, Chen HC, Chen SJ, Lin WC: **Epigenetic control of the expression of a primate-specific microRNA cluster in human cancer cells.** *Epigenetics* 2009, **4:**587–592.
7. Suh MR, Lee Y, Kim JY, Kim SK, Moon SH, Lee JY, Cha KY, Chung HM, Yoon HS, Moon SY, *et al*: **Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs.** *Dev Biol* 2004, **270:**488–498.
8. Bar M, Wyman SK, Fritz BR, Qi J, Garg KS, Parkin RK, Kroh EM, Bendoraite A, Mitchell PS, Nelson AM, *et al*: **MicroRNA discovery and profiling in human embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries.** *Stem Cells* 2008, **26:**2496–2505.
9. Laurent LC, Chen J, Ulitsky I, Mueller FJ, Lu C, Shamir R, Fan JB, Loring JF: **Comprehensive microRNA profiling reveals a unique human embryonic stem cell signature dominated by a single seed sequence.** *Stem Cells* 2008, **26:**1506–1516.
10. Ren J, Jin P, Wang E, Marincola FM, Stroncek DF: **MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cells.** *J Transl Med* 2009, **7:**20.
11. Morin RD, O'Connor MD, Griffith M, Kuchenbauer F, Delaney A, Prabhu AL, Zhao Y, McDonald H, Zeng T, Hirst M, *et al*: **Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells.** *Genome Res* 2008, **18:**610–621.
12. Cao H, Yang CS, Rana TM: **Evolutionary emergence of microRNAs in human embryonic stem cells.** *PLoS One* 2008, **3:**e2820.
13. Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C: **Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues.** *BMC Genomics* 2007, **8:**166.
14. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, *et al*: **Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs.** *Nat Genet* 2005, **37:**766–770.
15. Noguer-Dance M, Abu-Amero S, Al-Khtib M, Lefevre A, Coullin P, Moore GE, Cavaille J: **The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta.** *Hum Mol Genet* 2010, **19:**3566–3582.
16. Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, le Sage C, Nagel R, Nair S, Egan DA, Li A, Huang G, Klein-Szanto AJ, *et al*: **The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis.** *Nat Cell Biol* 2008, **10:**202–210.
17. Yang K, Handorean AM, Iczkowski KA: **MicroRNAs 373 and 520c are downregulated in prostate cancer, suppress CD44 translation and enhance invasion of prostate cancer cells in vitro.** *Int J Clin Exp Pathol* 2009, **2:**361–369.
18. Cairo S, Wang Y, de Reynies A, Duroure K, Dahan J, Redon MJ, Fabre M, McClelland M, Wang XW, Croce CM, Buendia MA: **Stem cell-like micro-RNA signature driven by Myc in aggressive liver cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107:**20471–20476.
19. Yan GR, Xu SH, Tan ZL, Liu L, He QY: **Global identification of miR-373-regulated genes in breast cancer by quantitative proteomics.** *Proteomics* 2011, **11:**912–920.
20. Flor I, Bullerdiek J: **The dark side of a success story: microRNAs of the C19MC cluster in human tumours.** *J Pathol* 2012, **227:**270–274.
21. Arora N, Scognamiglio T, Zhu B, Fahey TJ 3rd: **Do benign thyroid nodules have malignant potential? An evidence-based review.** *World J Surg* 2008, **32:**1237–1246.
22. Klemke M, Drieschner N, Laabs A, Rippe V, Belge G, Bullerdiek J, Sendt W: **On the prevalence of the PAX8-PPARG fusion resulting from the chromosomal translocation t(2;3)(q13;p25) in adenomas of the thyroid.** *Cancer Genet* 2011, **204:**334–339.
23. Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhaes J, Roque L, Trovisco V, Vieira de Castro I, Cardoso-de-Oliveira M, Fonseca E, Soares P, Sobrinho-Simoes M: **PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma.** *J Clin Endocrinol Metab* 2006, **91:**213–220.
24. Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA: **PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected].** *Science* 2000, **289:**1357–1360.
25. miRBase (Release 18): http://www.mirbase.org.
26. Toffanin S, Hoshida Y, Lachenmayer A, Villanueva A, Cabellos L, Minguez B, Savic R, Ward SC, Thung S, Chiang DY, *et al*: **MicroRNA-based classification of hepatocellular carcinoma and oncogenic role of miR-517a.** *Gastroenterology* 2011, **140:**1618–1628.
27. Fornari F, Milazzo M, Chieco P, Negrini M, Marasco E, Capranico G, Mantovani V, Marinello J, Sabbioni S, Callegari E, *et al*: **In hepatocellular carcinoma miR-519d is upregulated by p53 and DNA hypomethylation and targets CDKN1A/p21, PTEN, AKT3 and TIMP2.** *J Pathol* 2012. doi:10.1002/path.3995.
28. Abdelmohsen K, Kim MM, Srikantan S, Mercken EM, Brennan SE, Wilson GM, Cabo R, Gorospe M: **miR-519 suppresses tumor growth by reducing HuR levels.** *Cell Cycle* 2010, **9:**1354–1359.
29. Abdelmohsen K, Srikantan S, Kuwano Y, Gorospe M: **miR-519 reduces cell proliferation by lowering RNA-binding protein HuR levels.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105:**20297–20302.
30. Marasa BS, Srikantan S, Martindale JL, Kim MM, Lee EK, Gorospe M, Abdelmohsen K: **MicroRNA profiling in human diploid fibroblasts uncovers miR-519 role in replicative senescence.** *Aging (Albany NY)* 2010, **2:**333–343.
31. Tang W, David FB, Wilson MM, Barwick BG, Leyland-Jones BR, Bouzyk MM: **DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue.** *Cold Spring Harb Protoc* 2009, **2009:**pdb prot5138.

32. Klemke M, Drieschner N, Belge G, Burchardt K, Junker K, Bullerdiek J: **Detection of PAX8-PPARG fusion transcripts in archival thyroid carcinoma samples by conventional RT-PCR.** *Genes Chromosomes Cancer* 2012, **51**:402–408.
33. Drieschner N, Rippe V, Laabs A, Dittberner L, Nimzyk R, Junker K, Rommel B, Kiefer Y, Belge G, Bullerdiek J, Sendt W: **Interphase fluorescence in situ hybridization analysis detects a much higher rate of thyroid tumors with clonal cytogenetic deviations of the main cytogenetic subgroups than conventional cytogenetics.** *Cancer Genet* 2011, **204**:366–374.

doi:10.1186/1755-8166-5-40
Cite this article as: Rippe *et al.*: Activation of the two microRNA clusters C19MC and miR-371-3 does not play prominent role in thyroid cancer. *Molecular Cytogenetics* 2012 **5**:40.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

3.2 Publikation II: Expression of microRNAs of C19MC in different histologic types of testicular germ cell tumour (Flor et al., im Druck)

Als weitere Tumorentität wurden im Rahmen dieser Arbeit testikuläre Keimzelltumoren (TGCTs) untersucht. TGCTs werden unterteilt in Seminome, die ca. 45 % der Fälle ausmachen, und Nicht-Seminome (ca. 30–35 %). Die restlichen ca. 15–20 % sind Tumoren mit sowohl seminomatösen als auch nicht-seminomatösen Anteilen. Klinisch werden diese aber stets den Nicht-Seminomen zugeordnet. Bei den Nicht-Seminomen kann es sich um embryonale Karzinome (ECs) (14–20 % der Keimzelltumoren), Teratome (3–7 %), Dottersacktumoren (2 %; bei Erwachsenen nur als Mischtumor mit anderen Nicht-Seminom-Typen auftretend) oder Chorionkarzinome (< 0,5 %) sowie um Mischformen aus zwei oder mehr dieser Tumortypen handeln (Mikuz, 2008).
In TGCTs ist die Expression des Clusters miR-371-3 gut untersucht und es wird, mit Ausnahme der Teratome, in allen Typen von TGCTs überexprimiert (Voorhoeve et al., 2006; Gillis et al., 2007; Murray et al., 2010; Palmer et al., 2010; Bing et al., 2012; Dieckmann et al., 2012; Novotny et al., 2012). Bezüglich der Expression von C19MC gab es deutlich weniger Untersuchungen. In einer Studie von Novotny et al. (2012) wurden ECs und Seminome erwachsener Männer mittels Microarray untersucht und eine erhöhte Expression einiger C19MC-miRNAs in ECs im Vergleich zu normalem Hodengewebe festgestellt, wohingegen andere C19MC-miRNAs keine erhöhte Expression in ECs oder Seminomen aufwiesen. Bei der Untersuchung einiger Typen pädiatrischer Keimzelltumoren (sowohl von männlichen als auch von weiblichen Patienten) wurde ebenfalls eine Überexpression von C19MC-miRNAs in embryonalen Karzinomen festgestellt (Palmer et al., 2010).

Aufgrund der Tatsache, dass beide Cluster in der Plazenta (Liang et al., 2007) und in embryonalen Stammzellen (ESCs) (Bar et al., 2008; Cao et al., 2008; Laurent et al., 2008; Morin et al., 2008; Ren et al., 2009), aber auch in Schilddrüsenadenomen (Rippe et al., 2010) und einigen weiteren Tumorentitäten wie bestimmten pädiatrischen Gehirntumoren (Li et al., 2009; Pfister et al., 2009; Kleinman et al., 2014) und Nebenschilddrüsenkarzinomen coexprimiert werden (Vaira et al., 2012), vermuteten wir eine Expression von C19MC auch in TGCTs. Um dies zu untersuchen, wurde in Publikation II bei insgesamt 25 TGCTs unterschiedlicher Tumortypen und -stadien mittels qRT-PCR die Expression von miR-517a-3p,

-519a-3p, und -519c-3p gemessen. Normales Hodengewebe sowie andere normale adulte Gewebe (Schilddrüse, Endometrium und Duodenum) dienten als Kontrollen bzw. Vergleichsproben.

Für die C19MC-miRNAs wurden in Hodennormalgewebe Expressionswerte deutlich über dem anderer normaler adulter Gewebe gemessen (zwischen 53- und 1086fach). Bei der Untersuchung der TGCTs wurde eine unterschiedlich starke Expression abhängig von Tumortyp und -stadium festgestellt. Seminome und Teratome (bzw. Proben mit hohem Teratomanteil) im Tumorstadium 1 zeigten keine C19MC-Überexpression, sondern ein ähnliches (z. T. niedrigeres) Expressionsniveau wie Hoden-Normalgewebe. In den Stadien 2 und 3 wiesen sie jedoch eine erhöhte Expression auf. Nicht-Seminome (mit Ausnahme der Teratome) wiesen unabhängig vom klinischen Stadium erhöhte Werte auf, wobei die Expression mit höherem Stadium noch zunahm. Zusammenfassend konnte für alle drei untersuchten C19MC-miRNAs ein signifikanter Unterschied zwischen Nicht-Seminomen und Seminomen ($p < 0,01$) sowie zwischen den Proben in Tumorstadium 1 und den Proben in Tumorstadium 2 und 3 ($p < 0,01$) festgestellt werden. Eine erhöhte C19MC-Expression ist also mit erhöhter Malignität assoziiert.

Anschließend wurden bei 22 dieser 25 Patienten prä- und postoperativ entnommene Serumproben untersucht. Bei den meisten Nicht-Seminom-Patienten im Tumorstadium 1 wurde präoperativ ein erhöhter Serumwert, d. h. höher als in Kontroll-Seren gesunder Männer, gemessen. Die Fälle 13 und 16 wiesen jedoch keine erhöhten Serum-Werte auf und Fall 21 (> 95 % Teratom) wies erhöhte Serumwerte auf, obwohl im Tumorgewebe keine Überexpression festgestellt worden war. Die Werte der Seminom-Patienten im Stadium 1 waren auf dem Niveau der Kontrollen, was auch dem Zustand im Gewebe entspricht. Bei allen Patienten im Tumorstadium 1 mit erhöhtem präoperativen Serumwert, fiel dieser Wert nach der OP auf Kontrollniveau ab.

Bei allen Patienten im Tumorstadium 2 oder 3, egal welchen histologischen Typs, waren die präoperativen Serumwerte gegenüber den Kontrollen erhöht. Postoperativ wurde bei vier Patienten ein Serumwert auf Niveau der Kontrollen festgestellt, bei zwei Patienten war der Wert zwar gefallen, jedoch noch über Kontrollniveau und in einem Fall war der postoperativ gemessene Wert gegenüber dem präoperativen sogar erhöht.

Auch im Serum konnte ein statistisch signifikant höheres Level von miR-517a-3p bei Patienten im Stadium 2 oder 3 im Vergleich zu Patienten im Stadium 1 ($p < 0,01$) und bei Nicht-Seminom-Patienten im Vergleich zu Seminom-Patienten ($p < 0,01$) festgestellt werden.

II

Expression of microRNAs of C19MC in different histologic types of testicular germ cell tumours

Inga Flor, Meike Spiekermann, Thomas Löning, Klaus-Peter Dieckmann, Gazanfer Belge, Jörn Bullerdiek

*Cancer Genomics and Proteomics **13** (4) (im Druck)*

Eigenanteil

- Durchführung der RNA-Isolierung zusammen mit M. Spiekermann, cDNA-Synthese und Präamplifizierung sowie der qRT-PCR und deren Auswertung
- Statistische Auswertung
- Planung der Studie und Verfassen des Manuskripts zusammen mit J. Bullerdiek

Aus urheberrechtlichen Gründen ist die Publikation

Flor I, Spiekermann M, et al. (im Druck). *Expression of microRNAs of C19MC in different histologic types of testicular germ cell tumours*. Cancer Genomics and Proteomics **13**(4).

nicht enthalten.

3.3 Publikation III: The dark side of a success story: microRNAs of the C19MC cluster in human tumours (Flor und Bullerdiek, 2012)

Die Ergebnisse der Publikationen I und II legen nahe, dass die miRNAs von C19MC in verschiedenen Tumorentitäten unterschiedliche Wirkungen haben. Diese funktionelle Diversität von C19MC wurde in der Publikation III, einem „Invited Commentary“ zu dem Artikel In hepatocellular carcinoma miR-519d is up-regulated by p53 and DNA hypomethylation and targets CDKN1A/p21, PTEN, AKT3 and TIMP2 von Fornari *et al*. erschienen im *Journal of Pathology* (227(3)) im Jahr 2012, thematisiert.

Nach einer kurzen Einführung über miRNAs im Allgemeinen und über C19MC bezüglich dessen Evolution sowie Regulation und Expression unter physiologischen Bedingungen, wird die Rolle von miRNAs und insbesondere C19MC in Tumoren dargelegt. Die in dem kommentierten Artikel präsentierten Ergebnisse werden kurz zusammengefasst und in Bezug zu anderen Erkenntnissen über miRNAs von C19MC gesetzt. Dazu wurde eine umfassende Literaturrecherche zu den entsprechenden miRNAs durchgeführt. Ziel war es, einen möglichst vollständigen Überblick über die bisher in Tumoren beschriebenen Funktionen und Expressionsdaten zu C19MC zu erhalten. Von insgesamt 32 betrachteten Publikationen, in denen eine oder mehrere miRNAs von C19MC untersucht wurden, waren C19MC-miRNAs in 19 Untersuchungen unterexprimiert oder übten eine tumorsuppressive Funktionen aus, in 13 Publikationen überexprimiert bzw. mit onkogenen Funktion assoziiert.

Aus der Betrachtung der Literatur wurde demnach deutlich, dass die Funktionen von C19MC-miRNAs vielfältig und häufig sogar gegensätzlich sind und dass die Wirkung dieser miRNAs offenbar abhängig vom zellulären Kontext ist.

III

The dark side of a success story: microRNAs of the C19MC cluster in human tumours

Inga Flor und Jörn Bullerdiek

Journal of Pathology ***227****: 270-274*

Eigenanteil

- Verfassen des Manuskripts zusammen mit J. Bullerdiek

Journal of Pathology
J Pathol 2012; **227:** 270–274
Published online 30 April 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/path.4014

INVITED COMMENTARY

The dark side of a success story: microRNAs of the C19MC cluster in human tumours†

Inga Flor* and Jörn Bullerdiek

Centre for Human Genetics, University of Bremen, Germany

**Correspondence to: Inga Flor, Centre for Human Genetics, University of Bremen, Leobener Strasse ZHG, D-28359 Bremen, Germany. e-mail: iflor@uni-bremen.de*

†Invited commentary for: Fornari F, Milazzo M, Chieco P, *et al*. In hepatocellular carcinoma miR-519d is up-regulated by p53 and DNA hypomethylation and targets CDKN1A/p21, PTEN, AKT3 and TIMP2. *J Pathol* 2012; **227:** 275–285.

Abstract

MicroRNAs are a class of macromolecules of rapidly emerging significance for the pathogenesis of numerous human diseases, including cancer. Moreover, many of them hold great promise as valid biomarkers because of their high extracellular stability. Chromosome 19 harbours the largest cluster of microRNA genes known so far, which has developed in a very short time during mammalian evolution. Thus, in terms of evolution, gain of this cluster is an apparent success story. Nevertheless, we know very little about how functions of its microRNAs have contributed to this success and apparently, at least some of them can turn from Jekyll into Hyde and contribute to tumourigenesis. Recent work published in the *Journal of Pathology* by Fornari and colleagues, addressed here, reveals how members of that cluster are involved in the molecular pathogenesis of hepatocellular carcinomas.
Copyright © 2012 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: microRNAs; C19MC; epigenetic control; placenta; tumourigenesis

Received 7 February 2012; Revised 7 February 2012; Accepted 21 February 2012

No conflicts of interest were declared.

Introduction

In the past few years, tremendous advances in elucidating the biology of a class of small RNA molecules called microRNAs (miRNAs) have been made, leading to a rapidly evolving field of cellular biology and medicine. Up to now, roughly 1500 different miRNAs encoded by the human genome have been included in the miRNA repository miRBase [1]. miRNAs are small, non-coding 20–24 nucleotide-sized RNA molecules that are major mediators of post-transcriptional regulation of gene expression. They use so-called seed sequences to target the messenger RNA (mRNA) of protein-coding genes, thus controlling mRNA stability and translation.

It has been estimated that miRNAs are involved in the posttranscriptional regulation of no less than 30% of all protein-coding genes, assuring proper function of numerous cellular pathways and fundamental processes, such as differentiation, proliferation and cell death (reviewed in [2,3]). Some microRNA-coding genes are solitary, while others are organized in more or less large clusters, most likely reflecting their origin from a common ancestor in most cases. Often the genes encoding miRNAs reside in introns of protein-coding genes, but 'free' miRNA genes do exist as well [4].

Generally, there are striking associations between the location of miRNA genes and genomic alterations in cancer: miRNA genes often map to regions of the human genome that are known to be altered in tumours, eg by showing fragile sites, minimal regions of loss of heterozygosity, minimal regions of amplification or common breakpoint regions [5]. One such region, chromosomal band 19q13.4 [6], harbours the largest known cluster of human microRNA genes, C19MC (chromosome 19 microRNA cluster).

C19MC—a few mammalian species have joined an exclusive club

Chromosome 19 can be distinguished from all other human chromosomes by its exceptionally high gene density, with more than double the genome-wide average [7]. C19MC spans a genomic region of about 100 kb and encodes a group of 59 different mature miRNAs [1,8] that are likely to originate from one member of the neighbouring mir-371-3 cluster [9]. Many Alu elements are spread over the whole cluster, which may have facilitated the expansion of C19MC [9,10]. It has been proposed that all miRNAs of the cluster are encoded by one large Pol II transcript [11]. Apparently, the transcription of the cluster is under strict epigenetic control, as its expression is highly correlated with the methylation state of a CpG-rich

Copyright © 2012 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd. www.pathsoc.org.uk

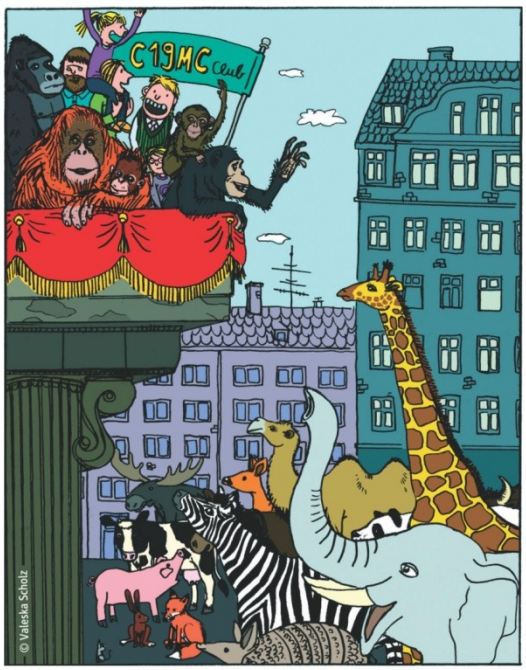

Figure 1. Among the mammals, those having the C19MC cluster are a young but exclusive club of primates only. Although representing the largest cluster of human miRNA genes of all, it has evolved in a relatively short time of primate evolution. We thank Valeska Scholz (www.valeskascholz.de) for creating this cartoon.

region located about 17.6 kb upstream of the miRNA cluster [12,13].

Intriguingly, C19MC is present exclusively in primates and therefore, in terms of evolution, has developed in relatively short time. This points to important but so far widely unknown functions constituting the basis of C19MCs success story during primate evolution (Figure 1). On the other hand, like many other miRNAs, those of the C19MC cluster apparently can display undesired effects when becoming deregulated. Of note, recently a correlation between the occurrence of chromosomal breakpoints and an over-expression of members of C19MC has been demonstrated in thyroid adenomas [14] and, as witnessed by a couple of papers, deregulation of miRNAs of C19MC seems to be relevant not only in benign tumours. A good example is the study by Fornari *et al*. [15], published in this issue of the *Journal of Pathology*, who were able to show that deregulation of a cluster member is involved in the pathogenesis of hepatocellular carcinomas.

Taking advantage from being a club-member—expression of C19MC in normal tissue

Despite the large size of C19MC and the fact that the number of its miRNA genes has expanded so rapidly during primate evolution, surprisingly little is known about the function of these miRNAs. While all studies have failed to detect a significant expression of these miRNAs in adult tissues [16,17], their expression has been noted in cells during early embryonic development [18–21]. In the study by Cao *et al* [22], human embryonic stem cells were found to express many miRNAs of C19MC: of 276 miRNAs detected in human embryonic stem cells, 37 (13.4%) alone were encoded by genes from C19MC. Of note, in these early phases of development C19MC is exclusively expressed from the paternal allele, whereas the maternal allele is epigenetically silenced [13]. Later during development, the paternal allele apparently becomes silenced as well, as revealed by the findings in a 20 week-old fetus: only the expression of *miR-498* was noted in the brain, but in all other organs investigated none of the remaining miRNAs of that cluster were detected [9]. Furthermore, methylation analysis has shown a methylated state of both alleles in normal adult tissues, eg muscle, lung and brain [13]. The only organ that escapes epigenetic silencing is the placenta, keeping the paternal C19MC allele active until birth [12,13]. In summary, we still know little about the expression patterns of the cluster during prenatal life but we know even less about the possible functions of its miRNAs. Nevertheless, it is tempting to assume that during the prenatal period they exert highly important functions, still waiting to be discovered.

What happens if Jekyll turns into Hyde?

Akin to protein-coding genes, miRNA genes can also act as oncogenes during the process of tumour development when affected by gain-of-function mutations. Accordingly, these miRNAs are referred to as 'oncomiRs'. Their oncogenic potential lies in the inhibition of tumour suppressor genes. A well-studied example of miRNAs acting as oncomiRs are the members of the *miR-17-92* cluster, mapping to chromosomal band 13q31.3. This cluster is frequently amplified in B cell lymphomas and lung cancer and confers pleiotropic oncogenic functions, eg by repressing *c-myc*-induced apoptosis (reviewed in [23]).

On the other hand, in past years several reports have shown that miRNAs can also display tumour-suppressive functions. In these cases, loss-of-function mutations of their genes are associated with tumourigenesis. The first miRNAs to which a tumour suppressor function have been attributed to map to a region on the long arm of chromosome 13 (13q14.2), which is frequently deleted in chronic lymphocytic leukaemia [24]. The loss of function of *miR-15a* and *miR-16-1* results in an over-expression of the anti-apoptotic B cell lymphoma 2 (Bcl2) protein [25].

Many miRNAs of C19MC, too, have been associated with oncomiR-like functions when they become re-expressed in tissues. As to hepatocellular carcinoma, Fornari *et al* [15] presented interesting data showing that over-expression of *miR-519d*, compared to normal

Copyright © 2012 Pathological Society of Great Britain and Ireland.
Published by John Wiley & Sons, Ltd. www.pathsoc.org.uk

and cirrhotic liver tissue, results from hypomethylation. Once activated, *miR-519d* promotes cell proliferation and invasion and impairs apoptosis following anticancer treatments. These functions, at least in part, are exerted through the direct targeting of CDKN1A/p21, PTEN, AKT3 and TIMP2. Moreover, Fornari *et al* postulated a regulatory loop between *miR-519d* and *p53*. *p53* binding to a consensus sequence within C19MC was enriched following treatment with the *mdm2*-inhibitor *nutlin-3*, or after hypomethylation induced by 5-aza-2′-deoxycytidine. In these elegant experiments, convincing evidence for C19MC being a direct transcriptional target of *p53* was thus obtained. In breast cancer, *miR-520c-3p* promotes tumour invasion and metastasis in breast cancer, due to the suppression of CD44 [26].

Nevertheless, miRNAs of C19MC do not only exert deleterious functions in adult tissues. While initially described as an oncomiR, in a recent paper *miR-520c-3p* has been implicated as a tumour-suppressive miRNA even in the same tumour entity, ie breast cancer, although its effects were apparently restricted to oestrogen receptor-negative tumours only [27]. At present, the induction of cellular senescence, ie an irreversible growth arrest, by *miR-519a-3p, miR-519b-3p* and *miR-519c-3p*, possibly through inhibition of HuR [28], seems to be the best-investigated mechanism classifying some miRNAs of the cluster as tumour suppressors. Accordingly, these miRNAs have also been found to be down-regulated in lung, kidney and ovarian tumour tissue as compared to corresponding normal tissue [29], supporting their classification as possible tumour suppressors. In another study, however, the up-regulation of one of these miRNAs, ie *miR-519a-3p*, correlated significantly with an advanced clinical stage of ovarian cancer [30]. An overview of the partially contradicting data on the roles of the different C19MC members in tumourigenesis is given in Figure 2.

This seemingly paradoxical situation is not unique for the miRNAs of C19MC. Similar 'conflicts' were, for example, noted for *miR-146a, miR-146-b-5p* and *miR-29* as well, where the underlying mechanisms have been studied in more detail to elucidate what turns Jekyll into Hyde. Apparently, the behaviour of these miRNAs depends on the cellular context in which they are expressed, leading to a wide range of functions from oncomiRs to tumour suppressors. Accordingly, miRNAs of this type have been classified as 'context-dependent' (reviewed in [56]).

For C19MC, the situation is further complicated by the fact that the deregulation of expression frequently affects all or most C19MC cluster members, giving rise to a myriad of possible dynamic interactions of the miRNAs with their upstream and downstream effectors, being part of partially overlapping networks. However, their potential action as tumour suppressors requires at least a biologically relevant baseline expression in the respective normal tissues, indicating that epigenetic silencing does not completely abolish

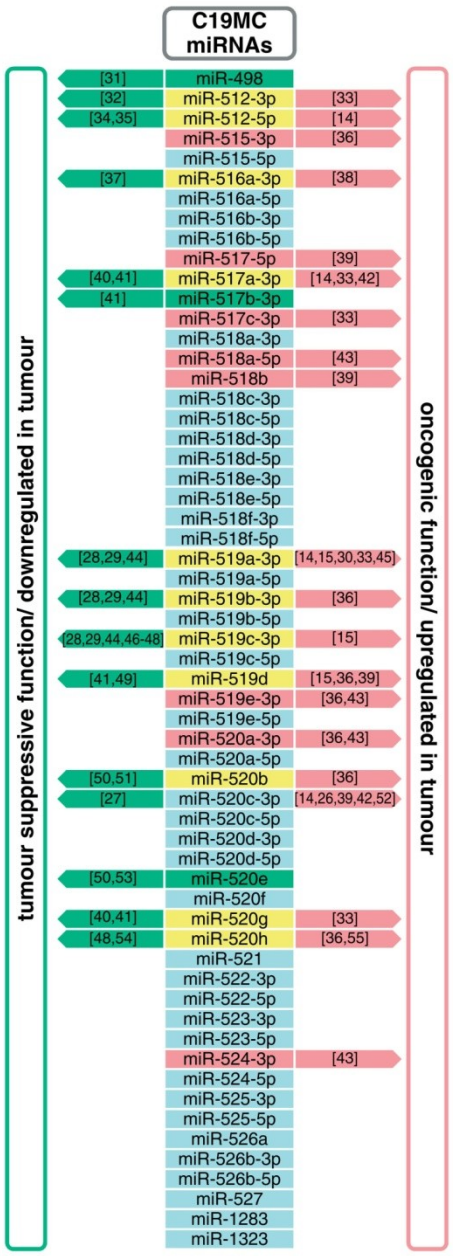

Figure 2. miRNAs of the C19MC cluster and their possible role in tumourigenesis. Some C19MC members have been reported to mediate oncogenic functions, whereas others were associated with tumour-suppressive functions. Moreover, several C19MC members were linked to both oncogenic and tumour-suppressive functions; thus, these miRNAs might be classified as 'context-dependent' miRNAs. This figure is intended to depict the diverse functions deduced from the available data. The references cited are not exhaustive.

C19MC expression. Generally, there is a lack of comparability of the expression results in different studies, since as a rule expression levels can only be judged in the particular system used. For further studies, placenta

Copyright © 2012 Pathological Society of Great Britain and Ireland.
Published by John Wiley & Sons, Ltd. www.pathsoc.org.uk

tissue could be used as a sort of standard for expression studies to enable easier comparison between studies.

The future challenge: what does it mean to be a club member—chances or problems?

C19MC is by far the largest human miRNA cluster but surprisingly little is known about its possible functions. From a realistic point of view, we are in the midst of just taking a glimpse at its action in normal tissue and during tumourigenesis. It seems reasonable to predict that, with a further gain of knowledge, C19MC will provide a variety of diagnostic and therapeutic targets in the fields of cancer. Many of the riddles of C19MC remain to be resolved, constituting a challenge for future work in that area.

References

1. miRBase, Release 18: http://www.mirbase.org
2. Bushati N, Cohen SM. MicroRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; **23**: 175–205.
3. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008; **9**: 102–114.
4. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, *et al*. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004; **14**: 1902–1910.
5. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, *et al*. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 2999–3004.
6. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer, 2012: http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman
7. Grimwood J, Gordon LA, Olsen A, *et al*. The DNA sequence and biology of human chromosome 19. *Nature* 2004; **428**: 529–535.
8. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, *et al*. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 2005; **37**: 766–770.
9. Zhang R, Wang YQ, Su B. Molecular evolution of a primate-specific microRNA family. *Mol Biol Evol* 2008; **25**: 1493–1502.
10. Lehnert S, Van Loo P, Thilakarathne PJ, *et al*. Evidence for co-evolution between human microRNAs and Alu-repeats. *PLoS One* 2009; **4**: e4456.
11. Bortolin-Cavaille ML, Dance M, Weber M, *et al*. C19MC microRNAs are processed from introns of large *Pol-II*, non-protein-coding transcripts. *Nucleic Acids Res* 2009; **37**: 3464–3473.
12. Tsai KW, Kao HW, Chen HC, *et al*. Epigenetic control of the expression of a primate-specific microRNA cluster in human cancer cells. *Epigenetics* 2009; **4**: 587–592.
13. Noguer-Dance M, Abu-Amero S, Al-Khtib M, *et al*. The primate-specific microRNA gene cluster (*C19MC*) is imprinted in the placenta. *Hum Mol Genet* 2010; **19**: 3566–3582.
14. Rippe V, Dittberner L, Lorenz VN, *et al*. The two stem cell microRNA gene clusters *C19MC* and *miR-371-3* are activated by specific chromosomal rearrangements in a subgroup of thyroid adenomas. *PLoS One* 2010; **5**: e9485.
15. Fornari F, Milazzo M, Chieco P, *et al*. In hepatocellular carcinoma *miR-519d* is upregulated by p53 and DNA hypomethylation and targets CDKN1A/p21, PTEN, AKT3 and TIMP2. *J Pathol* 2012; DOI: 10.1002/path.3995.
16. Liang Y, Ridzon D, Wong L, *et al*. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* 2007; **8**: 166.
17. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, *et al*. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 2007; **129**: 1401–1414.
18. Bar M, Wyman SK, Fritz BR, *et al*. MicroRNA discovery and profiling in human embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries. *Stem Cells* 2008; **26**: 2496–2505.
19. Laurent LC, Chen J, Ulitsky I, *et al*. Comprehensive microRNA profiling reveals a unique human embryonic stem cell signature dominated by a single seed sequence. *Stem Cells* 2008; **26**: 1506–1516.
20. Morin RD, O'Connor MD, Griffith M, *et al*. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res* 2008; **18**: 610–621.
21. Ren J, Jin P, Wang E, *et al*. MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cells. *J Transl Med* 2009; **7**: 20.
22. Cao H, Yang CS, Rana TM. Evolutionary emergence of microRNAs in human embryonic stem cells. *PLoS One* 2008; **3**: e2820.
23. Olive V, Jiang I, He L. mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; **42**: 1348–1354.
24. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, *et al*. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 15524–15529.
25. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, *et al*. miR-15 and *miR-16* induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 13944–13949.
26. Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, *et al*. The microRNAs *miR-373* and *miR-520c* promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol* 2008; **10**: 202–210.
27. Keklikoglou I, Koerner C, Schmidt C, *et al*. MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF-κB and TGFβ signaling pathways. *Oncogene* 2011; [Epub ahead of print 12 Dec 2011. DOI: 10.1038/onc.2011.571]
28. Marasa BS, Srikantan S, Martindale JL, *et al*. MicroRNA profiling in human diploid fibroblasts uncovers *miR-519* role in replicative senescence. *Aging (Albany NY)* 2010; **2**: 333–343.
29. Abdelmohsen K, Kim MM, Srikantan S, *et al*. miR-519 suppresses tumor growth by reducing HuR levels. *Cell Cycle* 2010; **9**: 1354–1359.
30. Kim TH, Kim YK, Kwon Y, *et al*. Deregulation of *miR-519a*, *153*, and *485-5p* and its clinicopathological relevance in ovarian epithelial tumours. *Histopathology* 2010; **57**: 734–743.
31. Schepeler T, Reinert JT, Ostenfeld MS, *et al*. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer. *Cancer Res* 2008; **68**: 6416–6424.
32. Chen F, Zhu HH, Zhou LF, *et al*. Inhibition of c-FLIP expression by *miR-512-3p* contributes to taxol-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep* 2010; **23**: 1457–1462.
33. Li M, Lee KF, Lu Y, *et al*. Frequent amplification of a chr19q13.41 microRNA polycistron in aggressive primitive neuroectodermal brain tumors. *Cancer Cell* 2009; **16**: 533–546.
34. Saito Y, Suzuki H, Tsugawa H, *et al*. Chromatin remodeling at Alu repeats by epigenetic treatment activates silenced microRNA-512-5p with downregulation of Mcl-1 in human gastric cancer cells. *Oncogene* 2009; **28**: 2738–2744.
35. Lv SQ, Kim YH, Giulio F, *et al*. Genetic alterations in microRNAs in medulloblastomas. *Brain Pathol* 2012; **22**: 230–239.

Copyright © 2012 Pathological Society of Great Britain and Ireland.
Published by John Wiley & Sons, Ltd. www.pathsoc.org.uk

36. Wu S, Huang S, Ding J, *et al*. Multiple microRNAs modulate *p21Cip1/Waf1* expression by directly targeting its 3′ untranslated region. *Oncogene* 2010; **29**: 2302–2308.
37. White NM, Chow TF, Mejia-Guerrero S, *et al*. Three dysregulated miRNAs control kallikrein 10 expression and cell proliferation in ovarian cancer. *Br J Cancer* 2010; **102**: 1244–1253.
38. Butz H, Liko I, Czirjak S, *et al*. Down-regulation of Wee1 kinase by a specific subset of microRNA in human sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; **95**: E181–191.
39. Pfister S, Remke M, Castoldi M, *et al*. Novel genomic amplification targeting the microRNA cluster at 19q13.42 in a pediatric embryonal tumor with abundant neuropil and true rosettes. *Acta Neuropathol* 2009; **117**: 457–464.
40. Yoshitomi T, Kawakami K, Enokida H, *et al*. Restoration of *miR-517a* expression induces cell apoptosis in bladder cancer cell lines. *Oncol Rep* 2011; **25**: 1661–1668.
41. Tanaka T, Arai M, Wu S, *et al*. Epigenetic silencing of microRNA-373 plays an important role in regulating cell proliferation in colon cancer. *Oncol Rep* 2011; **26**: 1329–1335.
42. Toffanin S, Hoshida Y, Lachenmayer A, *et al*. MicroRNA-based classification of hepatocellular carcinoma and oncogenic role of *miR-517a*. *Gastroenterology* 2011; **140**: 1618–1628; e1616.
43. Nakano H, Miyazawa T, Kinoshita K, *et al*. Functional screening identifies a microRNA, *miR-491*, that induces apoptosis by targeting Bcl-X(L) in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2010; **127**: 1072–1080.
44. Abdelmohsen K, Srikantan S, Kuwano Y, *et al*. miR-519 reduces cell proliferation by lowering RNA-binding protein HuR levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 20297–20302.
45. Pineau P, Volinia S, McJunkin K, *et al*. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 264–269.
46. To KK, Robey RW, Knutsen T, *et al*. Escape from *hsa-miR-519c* enables drug-resistant cells to maintain high expression of ABCG2. *Mol Cancer Ther* 2009; **8**: 2959–2968.
47. Cha ST, Chen PS, Johansson G, *et al*. MicroRNA-519c suppresses hypoxia-inducible factor-1α expression and tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2010; **70**: 2675–2685.
48. Li X, Pan YZ, Seigel GM, *et al*. Breast cancer resistance protein BCRP/ABCG2 regulatory microRNAs (*hsa-miR-328*, −519*c* and −520*h*) and their differential expression in stem-like ABCG2$^+$ cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2011; **81**: 783–792.
49. Hou YY, Cao WW, Li L, *et al*. MicroRNA-519d targets MKi67 and suppresses cell growth in the hepatocellular carcinoma cell line QGY-7703. *Cancer Lett* 2011; **307**: 182–190.
50. Cui W, Zhang Y, Hu N, *et al*. miRNA-520b and *miR-520e* sensitize breast cancer cells to complement attack via directly targeting 3′ UTR of CD46. *Cancer Biol Ther* 2010; **10**: 232–241.
51. Hu N, Zhang J, Cui W, *et al*. miR-520b regulates migration of breast cancer cells through targeting hepatitis B X-interacting protein and interleukin-8. *J Biol Chem* 2011; **286**: 13714–13722.
52. Liu P, Wilson MJ. *miR-520c* and *miR-373* upregulate *MMP9* expression by targeting *mTOR* and *SIRT1*, and activate the Ras/Raf/MEK/Erk signaling pathway and NF-κB factor in human fibrosarcoma cells. *J Cell Physiol* 2012; **227**: 867–876.
53. Zhang S, Shan C, Kong G, *et al*. MicroRNA-520e suppresses growth of hepatoma cells by targeting the NF-κB-inducing kinase (NIK). *Oncogene* 2011; [Epub ahead of print 21 Nov 2011. DOI: 10.1038/onc.2011.523]
54. Wang F, Xue X, Wei J, *et al*. hsa-miR-520h downregulates *ABCG2* in pancreatic cancer cells to inhibit migration, invasion, and side populations. *Br J Cancer* 2010; **103**: 567–574.
55. Su JL, Chen PB, Chen YH, *et al*. Downregulation of microRNA *miR-520h* by E1A contributes to anticancer activity. *Cancer Res* 2010; **70**: 5096–5108.
56. Kasinski AL, Slack FJ. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2011; **11**: 849–864.

Copyright © 2012 Pathological Society of Great Britain and Ireland.
Published by John Wiley & Sons, Ltd. www.pathsoc.org.uk

3.4 Publikation IV: Abundant expression and hemimethylation of C19MC in cell cultures from placenta-derived stromal cells (Flor et al., 2012)

Um eine Vorstellung von der natürlichen Funktion von C19MC zu erhalten, wurde nun die Plazenta näher betrachtet, da in diesem Gewebe C19MC physiologischerweise exprimiert wird (Bentwich et al., 2005; Liang et al., 2007; Bortolin-Cavaillé et al., 2009; Tsai et al., 2009).

Die Entwicklung der Plazenta beginnt mit der Implantation der Blastozyste am 6. Tag *post conceptionem* (p. c.) in den Uterus. Ab diesem Zeitpunkt differenzieren sich die Trophoblastzellen, welche die Blastozyste als einlagige Zellschicht umgrenzen, in den innen liegenden Zytotrophoblasten und den äußeren mehrkernigen Synzytiotrophoblasten, der durch Verschmelzung von Trophoblastzellen entsteht (Kaufmann, 2010). Der Synzytiotrophoblast verdrängt Zellen des Endometriums, bis die Blastozyste am ca. 12. Tag p. c. schließlich vollständig in diesem eingebettet ist (Huppertz, 2008). Die endometrialen Zellen werden in dieser Zeit durch die sogenannte Dezidualreaktion in Deziduazellen umgewandelt (Kaufmann, 2010).

Die wichtigsten funktionellen Einheiten der Plazenta, welche die physiologischen Austauschvorgänge zwischen Mutter und Embryo bzw. Fetus vermitteln, sind die Chorionzotten. Deren Entstehung beginnt mit der Bildung von Fortsätzen durch den Synzytiotrophoblasten, in die vom 12.–15. Tag p. c. auch Zytotrophoblastzellen einwachsen (Kaufmann, 2010). Ab dem 15. Tag p. c. wachsen extraembryonale Mesenchymzellen in die Zotten ein (Ulfig, 2005; Wilting, 2010). In der dritten Schwangerschaftswoche (SSW) differenziert sich das extraembryonale Mesenchym zu Bindegewebe, Makrophagen (Hofbauer-Zellen) und fetalen Blutgefäßen (James et al., 2012). Dieser von Trophoblast umgebene Kern der Zotten wird als Zottenstroma bezeichnet (Kaufmann, 2010). Währenddessen wachsen in einigen Zotten die Zytotrophoblastzellen durch den Synzytiotrophoblasten bis zur Dezidua durch und bilden dort eine Zellsäule, so dass sich diese Zotten in der Dezidua verankern (Haftzotten). Einige Zytotrophoblastzellen verlassen die Zellsäule und wandern weiter in die Dezidua und bis ins innere Drittel des Myometriums ein. Da sich diese Trophoblastzellen nun außerhalb der Zotten befinden, spricht man vom extravillösen Trophoblasten (EVT). Einige EVT-Zellen dringen in die uterinen Spiralarterien ein (endovaskulärer EVT), wo sie zunächst Plugs bilden, so dass nur Blutplasma in den intervillösen Raum fließen kann, weshalb im ersten Trimester hypoxische Bedingungen herrschen (Huppertz et al., 2012). Ab dem 4. Monat wandeln sie die

Spiralarterien in utero-plazentale Arterien um, die sich durch einen geringen Gefäßwiderstand und hohe Kapazität auszeichnen (Ji et al., 2013).

Laut Publikationen von Zhang et al. (2008) und Luo et al. (2009) wird C19MC ausschließlich im Synzytiotrophoblasten und nicht im Zottenstroma exprimiert. In diesen Veröffentlichungen waren Gewebeschnitte von Chorionzotten aus dem ersten Trimester bzw. aus reifer Plazenta mittels ISH bzw. FISH auf C19MC-miRNAs (genauer miR-498, -516-5p und -520e (Zhang et al., 2008) bzw. miR-517b-3p (Luo et al., 2009)) hin untersucht worden. Beide Studien wiesen die jeweils untersuchten miRNAs ausschließlich im Synzytiotrophoblasten nach, wohingegen sie im Zottenstroma nicht detektiert wurden.
Zur Validierung bzw. Überprüfung dieser Ergebnisse wurden in dieser Arbeit plazentare Stromazellen noch einmal gesondert betrachtet und dazu Langzeit-Zellkulturen von Chorionzottenbiopsien untersucht. Diese Zellkulturen bestehen ausschließlich aus mesenchymalen Stamm-/Stromazellen (MSCs) und enthalten keine Trophoblastzellen (Songster et al., 1992; Yong et al., 2011). miR-520c-3p wurde in 20 Langzeit-Zellkulturen von Chorionzottenzellen, die zwischen der 10. und 14. SSW im Zuge einer Chorionzottenbiopsie entnommen wurden, gemessen. Zusätzlich wurden miR-517a-3p sowie miR-519a-3p in sechs bzw. vier dieser Zellkulturen gemessen. Als Vergleichsproben dienten ein Schilddrüsenadenom ohne (S925) und eines mit 19q13.4-Translokation (S958) und entsprechend niedriger bzw. hoher Expression von C19MC. In allen Stromazellen des ersten Trimesters war die Expression von miR-517a-3p und miR-519a-3p ähnlich hoch wie im Schilddrüsenadenom mit 19q13.4-Translokation. Im Fall von miR-520c-3p lagen die gemessenen Werte sogar noch deutlich höher.
Um auszuschließen, dass diese hohe Expression auf Erst-Trimester-Stromazellen beschränkt ist, wurde eine Langzeitzellkultur von reifer Plazenta angelegt. Außerdem wurde FFPE-Plazentagewebe und FFPE-Gewebe der chorioamniotischen Membran der gleichen Plazenta untersucht. Auch in den Stromazellen der reifen Plazenta wurden für miR-519a-3p und miR-517a-3p ähnlich hohe bzw. für miR-520c-3p sogar höhere Expressionslevel als in S958 gemessen. Im zugehörigen Plazentagewebe sowie der chorioamniotischen Membran wurden ebenfalls hohe Expressionen auf dem Niveau von S958 festgestellt.

Die Expression von C19MC wird durch eine *upstream* gelegene CpG-Insel gesteuert und erfolgt in der Plazenta ausschließlich vom paternalen Allel (Tsai et al., 2009; Noguer-Dance et al., 2010). Um den Methylierungsstatus auch in den Stromazellkulturen zu bestimmen, wurde bei einer der Erst-Trimester-Stromazellkulturen ein Bereich der CpG-Insel mittels PCR amplifiziert und in *E. coli* JM109 Bakterien kloniert. Von den 20 sequenzierten Klonen waren 19 auswertbar. Neun davon waren zwischen 84 und 100 % methyliert (bezogen auf die im untersuchten Bereich vorhandenen CpG-Stellen), ein Klon war zu 63 % methyliert. Die restlichen Klone waren an allen untersuchten CpG-Stellen unmethyliert. Daraus ergibt sich ein Verhältnis von ca. 1:1 von methylierten zu unmethylierten Klonen, was dafür spricht, dass die Erst-Trimester-Stromazellen ein methyliertes und ein unmethyliertes Allel besitzen. Um dieses Ergebnis zu validieren, wurde eine Erst-Trimester-Stromazellkultur mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-2′-desoxycytidin behandelt und anschließend die miR-520c-3p-Expression gemessen. Aufgrund der Tatsache, dass bereits eine hohe Expression von einem Allel vorliegt, kann die Demethylierung des zweiten Allels maximal eine Verdopplung der Expression bewirken. Tatsächlich steigerte sich die Expression lediglich auf das 1,3fache gegenüber der unbehandelten Kontrollkultur.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass C19MC nicht ausschließlich in Trophoblastzellen, sondern auch in den MSCs von Erst-Trimester- und reifer Plazenta stark exprimiert wird und dass das Methylierungsmuster in Zellkulturen von Stromazellen dem von nativer Plazenta entspricht. Außerdem wurde gezeigt, dass auch in der chorioamniotischen Membran C19MC hoch exprimiert wird.

IV

Abundant expression and hemimethylation of C19MC in cell cultures from placenta-derived stromal cells

Inga Flor, Armin Neumann, Catharina Freter, Burkhard Maria Helmke, Marc Langenbuch, Volkhard Rippe, Jörn Bullerdiek

Biochemical and Biophysical Research Communications ***422*** *(3): 411 – 416*

Eigenanteil

- Durchführung der 5-Aza-dC-Behandlung, RNA-Isolierung und cDNA-Synthese sowie der qRT-PCR und deren Auswertung
- Durchführung und Auswertung der DNA-Methylierungsanalyse zusammen mit C. Freter
- Planung der Studie und Verfassen des Manuskripts zusammen mit J. Bullerdiek

Biochemical and Biophysical Research Communications 422 (2012) 411–416

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Abundant expression and hemimethylation of C19MC in cell cultures from placenta-derived stromal cells

Inga Flor [a], Armin Neumann [b], Catharina Freter [a], Burkhard Maria Helmke [c,1], Marc Langenbuch [d], Volkhard Rippe [a], Jörn Bullerdiek [a,*]

[a] Zentrum für Humangenetik, Universität Bremen, Leobener Str. ZHG, D-28359 Bremen, Germany
[b] Praxis für Pränatalmedizin am Klinikum Links der Weser, Senator-Weßling-Str. 1, D-28277 Bremen, Germany
[c] Institut für Pathologie, Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 220/221, D-69120 Heidelberg, Germany
[d] Krankenhaus Cuxhaven GmbH, Frauenklinik, Altenwalder Chaussee 10, 27474 Cuxhaven, Germany

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 March 2012
Available online 7 May 2012

Keywords:
MicroRNA
C19MC
Placenta
Cell cultures
Mesenchymal stromal cells
Epigenetics

ABSTRACT

MicroRNAs of the chromosome 19 microRNA cluster (C19MC) are known to be abundantly expressed in the placenta. Their genes are located on the long arm of chromosome 19 and seem to be part of a large imprinted region. Although the data available so far suggest important functions in the placenta, no data are available on their general expression patterns in cultures of placenta-derived mesenchymal stromal cells (PDMSC). Surprisingly, qRT-PCR on tissue cultures from first-trimester and term placenta mesenchymal stromal cells showed an abundant expression of the cluster members miR-517a-3p, miR-519a-3p, and miR-520c-3p. Accordingly, analyses of methylation patterns suggested that these cells had escaped methylation and epigenetic silencing, respectively, of the paternal allele. This was confirmed by the results of treatment of chorionic villous stromal cells by the demethylating agent 5-Aza-2′-deoxycytidine. Our results offer clear evidence that, in contrast to what is suggested in previous papers, members of C19MC are highly expressed in PDMSC indicating that their placenta-specific functions are not restricted to the trophoblast.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

For a successful pregnancy the proper development and function of the placenta are of utmost importance. This, in turn, seems to depend partly on the expression of microRNAs (miRNAs) which is implied by the fact that miRNAs in general are particularly abundant in the placenta [1]. Of the whole miRNA population expressed in the placenta the miRNAs of C19MC ("chromosome 19 microRNA cluster") constitute a signification portion [2] and some members of that cluster even belong to the most abundant placental miRNAs. C19MC encodes more than 50 mature miRNAs [3] sharing common seed sequences [4]. The cluster, mapping to chromosomal band 19q13, constitutes the largest human miRNA cluster known so far and is primate-specific [3].

Whereas miRNAs of C19MC have been found to be abundantly expressed in term placenta virtually no expression was observed in other normal adult human tissues [2,3,5] suggesting that its members serve crucial placenta-specific functions. By RT-PCR analysis Zhang et al. [6] detected the expression of 21 out of the 46 pre-miRNAs of C19MC in a human placenta from a 5-week embryo (Carnegie stage 13 or 14 embryo) and *in situ* data indicated that three miRNAs tested (miR-498, miR-516-5p, and miR-520e) were preferentially expressed in the cytoplasm of the syncytiotrophoblast in normal term placenta while being absent from the chorionic villi mesenchymal stroma core. Luo et al. [5] also addressed this issue by performing *in situ* hybridization (ISH) for miR-517b in first-trimester and term placenta chorionic villi. They obtained similar results detecting miR-517b exclusively in the trophoblast layer with dominant signals in the syncytiotrophoblast.

The expression of C19MC is highly correlated with the methylation state of a distal CpG-rich region located about 17.6 kb upstream of the miRNA cluster [7] and regulated by genomic imprinting with only the paternally inherited allele being expressed in the placenta [8]. Interestingly, C19MC maps near another imprinted gene, i.e. *ZNF331* gene [9], which underlies maternal expression [10,11] and may thus belong to a previously unrecognized large imprinted chromosomal domain. Members of

* Corresponding author. Fax: +49 421 21861505.
E-mail addresses: iflor@uni-bremen.de (I. Flor), praenataldiagnostik@klinikum-bremen-ldw.de (A. Neumann), catharina_freter@web.de (C. Freter), Burkhard.Helmke@elbekliniken.de (B.M. Helmke), frauenklinik@skh-cux.de (M. Langenbuch), vrippe@uni-bremen.de (V. Rippe), bullerd@uni-bremen.de (J. Bullerdiek).

[1] Present address: Institut für Pathologie, Elbe Kliniken Stade-Buxtehude, Bremervörder Str. 111, D-21682 Stade, Germany.

0006-291X/$ - see front matter © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.004

C19MC have also been found to be expressed in human embryonic stem cells (hESCs) [4,12–14]. However, to the best of our knowledge, no studies on C19MC in cultures of placenta-derived stromal cells have been reported so far. We have thus quantified the expression of three members of C19MC, i.e. miR-517a-3p, miR-519a-3p, and miR-520c-3p in placenta-derived mesenchymal stromal cells. Cultures of these cells that are known to contain mesenchymal stem cells are of great promise in regenerative medicine [15–17].

2. Materials and methods

2.1. Tissue, cell culture and cytogenetic analyses

2.1.1. First-trimester chorionic villi stromal cells

For cell cultures of chorionic villi, first-trimester samples (10–14 weeks of gestation) were collected by transabdominal chorionic villus sampling (CVS) for prenatal cytogenetic diagnosis. Cell cultures were set up following routine methods for establishing cultures of chorionic villi stromal cells as, e.g., outlined by Portmann-Lanz et al. [18] and Yong et al. [19] with a few modifications. A cytogenetic analysis was performed by standard procedures. The surplus cell cultures were donated to this study after informed written consent given by the patients.

2.1.2. Term placenta, chorioamniotic membrane and stromal cells

Samples of a term placenta as well as from the chorioamniotic membrane were obtained after delivery with informed written consent given by the mother. The collected tissues were fixed in 4% formalin and embedded in paraffin. A further sample of placenta was stored in Hank's solution and subjected to cell culture as described above.

2.1.3. Thyroid tumors

A subgroup of thyroid adenomas is shown to overexpress the C19MC due to chromosomal rearrangements [20]. Hence, an adenoma of this subtype served as positive control (S958). In contrast, a cytogenetically normal adenoma was used as a negative control (S925).

The tissue samples were obtained from patients undergoing thyroid resection and immediately stored in liquid nitrogen.

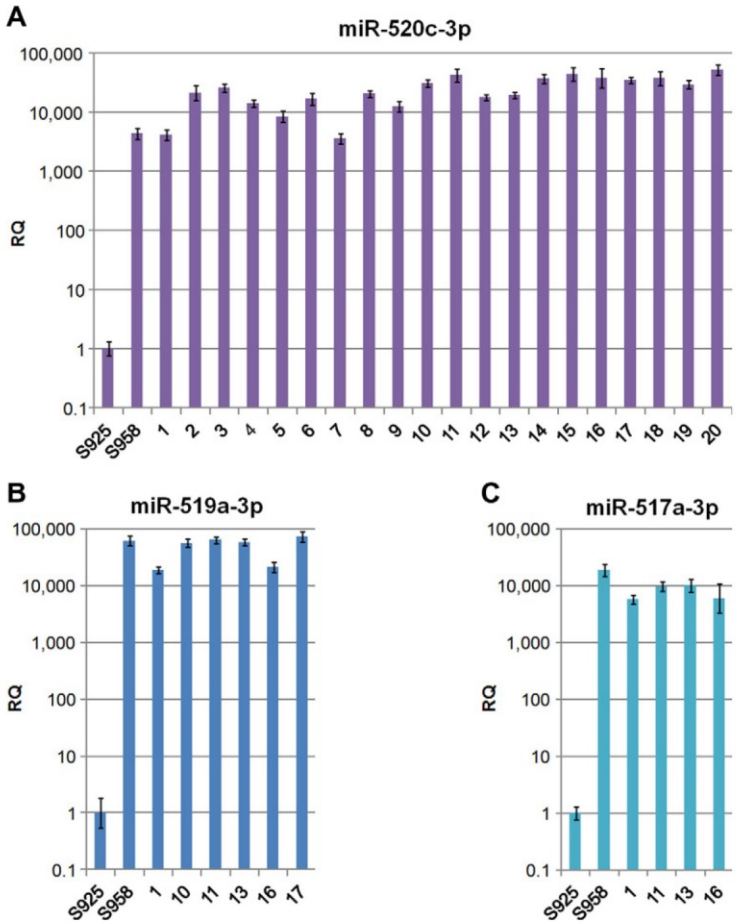

Fig. 1. First-trimester placental villous-derived stromal cells strongly express miR-520c-3p, miR-519a-3p, and miR-517a-3p. Relative expression of miR-520c-3p (A), miR-519a-3p (B), and miR-517a-3p (C) was quantified in first-trimester placental villous-derived stromal cells (1–20). The results obtained are compared with those from a thyroid tumor with 19q13 rearrangement known to overexpress C19MC (positive control S958) and a thyroid tumor without such a rearrangement showing low expression of C19MC (calibrator S925, set 1). RQ: relative quantity (logarithmic scale).

Table 1
Karyotypes and weeks of gestation of first-trimester chorionic villi samples used in this study.

Sample no.	Karyotype	Week of gestation
1	46,XX	11 + 6
2	45,X	12 + 4
3	46,XY	12 + 4
4	47,XY, + mar/46,XY	12 + 5
5	46,XX	14 + 1
6	47,XXX	12 + 0
7	47,XX, + 18	12 + 1
8	47,XY, + 21	12 + 2
9	46,XY	10 + 3
10	46,XY	13 + 2
11	46,XY	13 + 4
12	46,XX	10 + 0
13	46,XY	14 + 2
14	45,XY, + 21	13 + 2
15	46,X	12 + 4
16	46,XY	12 + 4
17	46,XX	10 + 0
18	46,XX	12 + 5
19	45,X	12 + 2
20	47,XX + 21	12 + 5

2.2. RNA isolation, reverse transcription and real-time PCR

Total RNA from cell culture and frozen samples was isolated using QIAGEN miRNEasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Total RNA isolation from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples was carried out using the innuPREP Micro RNA Kit (Analytik Jena AG, Jena, Germany) for RNA isolation according to the manufacturer's instructions with the following modifications: Lysis of the paraffin sections preceding RNA isolation was conducted using TLS-Lysis Solution and Proteinase K from the innuPREP DNA Micro Kit (Analytik Jena AG, Jena, Germany) without prior deparaffinization. Sections were incubated for 1 h at 60 °C and 15 min at 80 °C.

To quantify the expression of miR-520c-3p, miR-519a-3p, and miR-517a-3p reverse transcription and real-time PCR were performed as described previously [20] using TaqMan microRNA RT Kit, microRNA assays and Universal PCR Master Mix (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA). 200 ng of total RNA were used for reverse transcription. Relative quantity (RQ) was calculated using the ΔΔCt method [21]. RNU6B served as endogenous control for normalization.

2.3. DNA methylation analysis

To determine the methylation status of the CpG island upstream of C19MC DNA was isolated from one sample of cultured first-trimester chorionic villi cells (sample 10) using QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Two micrograms of DNA was then subjected to bisulphite conversion using the EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, Irvine, USA) following the manufacturer's protocol. PCR was performed using ZymoTaq DNA Polymerase (Zymo Research, Irvine, USA) with the following conditions: initial denaturation for 10 min at 95 °C, then 35 cycles of 95 °C for 30 s, 51 °C for 30 s and 72 °C for 30 s, then followed by a final elongation phase of 7 min at 72 °C. The primers (biomers, Ulm, Germany) used were AAGGTTGGTTTTTTTATTTGTAAA (forward primer) and ACAAATTCTAATCCCTCAAAAA (reverse primer). The PCR product was then cloned into pGEM-T Easy vector (Promega, Mannheim, Germany) and 20 clones were sequenced.

2.4. Treatment of cell cultures with the DNA methyltransferase inhibitor 5-Aza-2′-deoxycytidine

A first-trimester chorionic villi cell culture (case 3) was treated with 2.5 μM 5-Aza-2′-deoxycytidine (5-Aza-dC) in culture media for 72 h. An untreated cell culture of the same case served as control.

3. Results

3.1. Abundant expression of miR-520c-3p, miR-519a-3p, and miR-517a-3p in stromal cells from first-trimester chorionic villi

Since so far no studies on C19MC in cultures of placenta-derived stromal cells have been conducted we have quantified the expression of three members of C19MC, i.e., miR-520c-3p, miR-519a-3p, and miR-517a-3p in first-trimester chorionic villi-derived mesenchymal stromal cells.

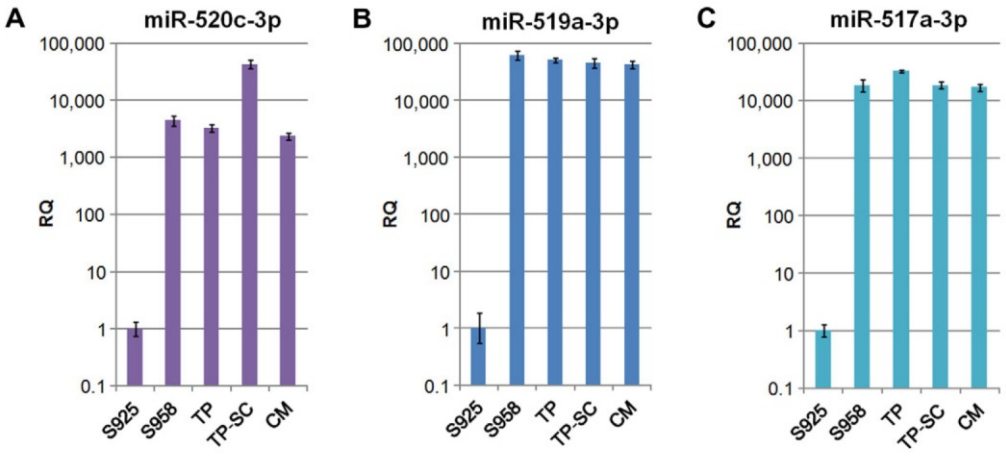

Fig. 2. Term placenta-derived stromal cells strongly express miR-520c-3p, miR-519a-3p, and miR-517a-3p. Relative expression of miR-520c-3p (A), miR-519a-3p (B), and miR-517a-3p (C) was quantified in term placenta-derived stromal cells (TP-SC) as well as in native term placenta (TP) and chorioamniotic membrane (CM). The results obtained are compared with those from a thyroid tumor with 19q13 rearrangement known to overexpress C19MC (positive control S958) and a thyroid tumor without such a rearrangement showing low expression of C19MC (calibrator S925, set 1). RQ: relative quantity (logarithmic scale).

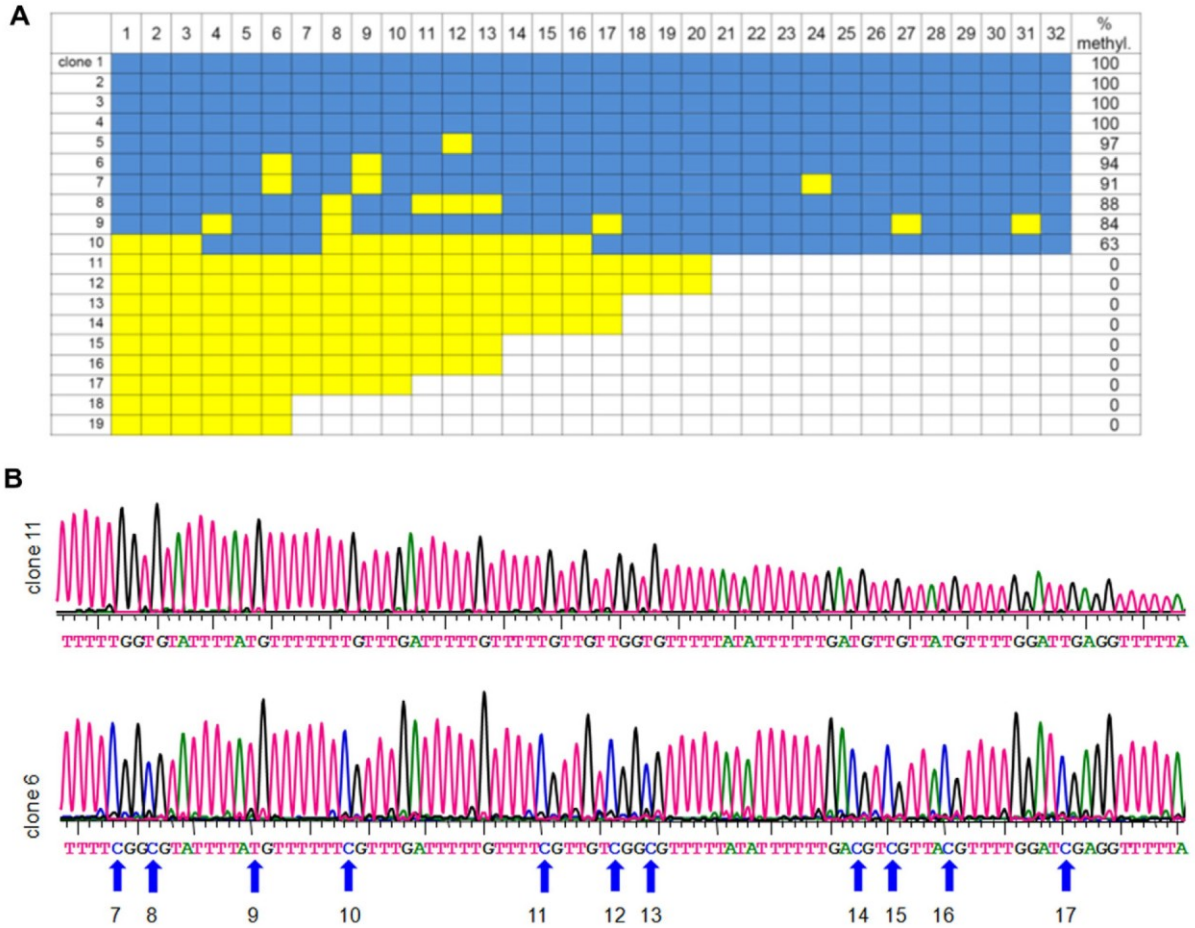

Fig. 3. Hemi-methylation of the CpG island regulating the expression of C19MC in first-trimester placental villous-derived stromal cells. Genomic DNA isolated from first-trimester placental villous-derived stromal cells (case 10) was bisulphite treated and part of the C19MC CpG island amplified by PCR. The PCR product was cloned and 20 clones were sequenced. (A) Diagram showing the methylation pattern of 19 clones analyzed. Methylated sites are represented by blue boxes and unmethylated sites by yellow boxes. White boxes: sites not analyzed. In roughly one half of the clones at least 84% of the sites were found to be methylated. (B) As an example parts of the chromatograms of two different clones are shown. The lower chromatogram shows the sequence of a methylated clone, the upper one the sequence of an unmethylated clone. Blue arrows indicate the potential methylation sites. Numbers below the arrows indicate the CpG sites as in (A).

Long-term chorionic villi cell cultures are considered to consist of only mesenchymal cells as they originate from the villous mesenchymal core [22]. They have been shown to be free of trophoblast cells [19] and the cells obtained from long-term chorionic villi cell cultures display typical characteristics of mesenchymal stem cell (MSCs) [18,23]. Expression of miR-520c-3p was quantified in 20 long-term cell cultures from first-trimester chorionic villi between 10 and 14 weeks of gestation (Fig. 1 A, Table 1). In addition, miR-519a-3p and miR-517a-3p were quantified in six and four of these samples, respectively (Fig. 1B and C).

In all samples of chorionic villi stromal cells the expression levels of the three miRNAs miR-520c-3p, miR-519a-3p, and miR-517a-3p were comparable to those observed in the positive control S958. In case of miR-520c-3p the expression in most samples even clearly exceeded that of S958.

3.2. Abundant expression of miR-520c-3p, miR-519a-3p, and miR-517a-3p in stromal cells from term placenta

To check whether the high expression of C19MC in chorionic villi derived stromal cells is restricted to early pregnancy or is maintained throughout pregnancy we next quantified the expression of miR-520c-3p, miR-519a-3p, and miR-517a-3p in term placenta-derived mesenchymal stromal cells (Fig. 2A–C). The expression levels of miR-519a-3p and miR-517a-3p were comparable to those observed in the positive control S958 and also to the expression levels of native term placenta tissue obtained from the same placenta. The expression of miR-520c-3p in cultured stromal cells again exceeded that of S958 and native term placenta. We also observed a comparably strong expression of all miRNAs in chorioamniotic membrane.

3.3. In stromal cells from first-trimester chorionic villi the imprinting patterns are identical to those previously observed in term placentae

Since the expression of C19MC is known to depend on the methylation of an upstream CpG island [7,8] we were interested to see if this island shows a heterozygous methylation pattern in the stromal cells as well. We thus isolated DNA from one of the samples of stromal cells from first-trimester chorionic villi also used for miRNA quantification (case 10). After bisulphite modification, PCR amplification, and cloning 20 clones were sequenced. Of

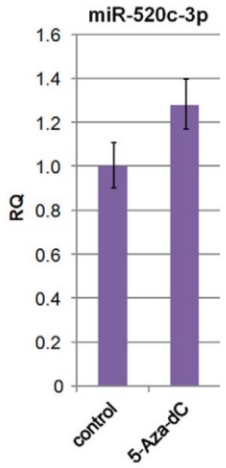

Fig. 4. Treatment of first-trimester placental villous-derived stromal cells with 5-Aza-dC leads to a slight increase of the expression of miR-520c-3p. First-trimester placental villous-derived stromal cells were treated with 2.5 μM 5-Aza-2′deoxycytidine (5-Aza-dC) for 72 h. The relative expression of miR-520c-3p was quantified and compared to that of the untreated control. RQ: relative quantity.

these, nine clones revealed methylation of 84 to 100% of CpG sites analyzed. One clone showed methylation of 63% of the CpG sites analyzed. Of the remaining clones nine did not show evidence for methylation of the analyzed sites (Fig. 3) and one clone was inadequate for analysis. This pattern reflects a 1:1 ratio of methylated to unmethylated clones.

To further confirm this finding we used 5-Aza-2′-deoxycytidine (5-Aza-dC) to demethylate CpG sites of a sample of stromal cells (case 3) and measured the expression of miR-520c-3p after 72 h of treatment with 5-Aza-dC. Given the fact that these cells, as was demonstrated above, possess one unmethylated allele which presumably gives rise to the high expression of miR-520c-3p (cf. Fig. 1A), the demethylation of the second allele can at most cause a twofold increase in expression. As expected the treatment of the cells with 5-Aza-dC for 72 h resulted in a slight increase (1.3fold) of the expression of miR-520c-3p as compared to the untreated control (Fig. 4).

4. Discussion

This is the first report aimed at a detailed analysis of the expression of miRNAs of C19MC in cultures of placenta-derived stromal cells and at the regulation of their expression.

Compared to other organs the human placenta displays unique characteristics of invasive growth and modulation of the mother's immune system to tolerate the semi-allogenic embryo. In addition, it is a rich source of mesenchymal stem cells. Recently, research into the expression of miRNAs in the placenta has attracted a lot of interest. C19MC located on the long arm of chromosome 19 harbors numerous of these miRNA genes whose regulation underlies epigenetic silencing in almost all adult tissues. The miRNAs of this cluster not only share common seed sequences [4] but are also supposed to originate from a common ancestor, i.e., a member of the *miR-371-3* cluster [6] that maps in close proximity to C19MC. Previous papers showed a placenta-specific expression of all tested C19MC genes and, more specifically, in the trophoblast. Herein, we were able to demonstrate abundant expression of C19MC members in cultures of stromal cells of first-trimester as well as term placentae. Apparently, the high expression results from a methylation pattern as described for native placental tissue with a methylated maternal allele and an unmethylated paternal allele [8]. As the most likely explanation, these cells seem to escape epigenetic silencing. As an alternative explanation, demethylation of the regulatory CpG island [7] may occur as a result of the cell culture conditions. A similar mechanism has recently, e.g., been described to be responsible for the upregulation of miR-519d, another member of C19MC, in hepatocellular cancer [24]. However, these tumors revealed gradual undermethylation of the respective genomic region. In contrast, the placenta stromal cells displayed a methylation pattern clearly distinguishing between two alleles (methylated/unmethylated) speaking in favor of the former hypothesis. Accordingly, demethylation by 5-Aza-dC leads to moderate effects only because one completely unmethylated allele already results in an abundant expression of the miRNAs from C19MC. Thus, the maximal effect that could be expected would be a twofold increase of the expression. In contrast, 5-Aza-dC treatment of cells characterized by two-allele methylation results in a strong increase of expression [25].

Some C19MC's miRNAs were classified as so-called oncomiRs because of their association with invasiveness and metastazation. As to the mechanisms explaining this association suppression of CD44 has been discussed [26,27]. Certainly, both functions fit well with a role of this cluster in the human placenta in particular during early pregnancy. Trophoblast invasion of the decidua and the myometrium has to occur early during pregnancy (for review see [28]). Simultaneously, the size of the placenta grows dramatically accompanied by strong proliferation of the villi. Similar functions supporting proliferation and invasiveness have also been described for miR-520c-3p, one of the members of C19MC analyzed herein in detail. Furthermore, Liu and Wilson [29] were able to show that along with miR-373 miR-520c efficiently suppresses the translation of SIRT1 and mTOR thus activating the Ras/Raf/MEK/Erk signaling pathway. On the other hand a strong overexpression resulting from clonal chromosomal rearrangements is a recurrent finding in adenomas of the thyroid [20] and there is no evidence that corresponding tumors are at higher risk to undergo malignant transformation. Directly conflicting data to those associating miR-520c-3p with metastazation [26] have been reported quite recently by Keklikoglou et al. [30] who showed a metastasis-suppressive role of miR-520/373 attributed to direct suppression of TGFBR2.

However, apparently many of the functions of C19MC still remain to be elucidated.

Of note, in a recent paper by Donker et al. [31] it was shown that C19MC miRNAs are the predominant miRNA species expressed in trophoblast-derived exosomes. Therefore, it seems tempting to speculate that at least some of its miRNAs do not exert their effects in the placenta cells but in target cells of exosomes secreted by the trophoblast and stromal cells of the villi. The trophoblast is known to "secrete" a high amount of exosomes that seem to serve important functions during pregnancy, e.g. placenta-derived exosomes (PDE) have been shown to interact with immune cells thus numbing the immune response [32]. Accordingly, miRNAs of C19MC when packed into exosomes may serve important functions in the feto-maternal communication not restricted to the trophoblast.

In summary, the preferential expression of members of C19MC in cultures of placenta-derived stromal cells suggests important functions in this organ. Its miRNAs may serve quite different functions depending as to whether they act in the cells they are expressed in or in target cells of exosomes they release.

Acknowledgments

We thank Henrieke Förster and Denis Schaap for valuable technical assistance.

References

[1] J.F. Mouillet, T. Chu, Y. Sadovsky, Expression patterns of placental microRNAs, Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol. 91 (2011) 737–743.

[2] Y. Liang, D. Ridzon, L. Wong, C. Chen, Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues, BMC Genomics 8 (2007) 166.

[3] I. Bentwich, A. Avniel, Y. Karov, R. Aharonov, S. Gilad, O. Barad, A. Barzilai, P. Einat, U. Einav, E. Meiri, E. Sharon, Y. Spector, Z. Bentwich, Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs, Nat. Genet. 37 (2005) 766–770.

[4] L.C. Laurent, J. Chen, I. Ulitsky, F.J. Mueller, C. Lu, R. Shamir, J.B. Fan, J.F. Loring, Comprehensive microRNA profiling reveals a unique human embryonic stem cell signature dominated by a single seed sequence, Stem Cells 26 (2008) 1506–1516.

[5] S.S. Luo, O. Ishibashi, G. Ishikawa, T. Ishikawa, A. Katayama, T. Mishima, T. Takizawa, T. Shigihara, T. Goto, A. Izumi, A. Ohkuchi, S. Matsubara, T. Takeshita, Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes, Biol. Reprod. 81 (2009) 717–729.

[6] R. Zhang, Y.Q. Wang, B. Su, Molecular evolution of a primate-specific microRNA family, Mol. Biol. Evol. 25 (2008) 1493–1502.

[7] K.W. Tsai, H.W. Kao, H.C. Chen, S.J. Chen, W.C. Lin, Epigenetic control of the expression of a primate-specific microRNA cluster in human cancer cells, Epigenetics 4 (2009) 587–592.

[8] M. Noguer-Dance, S. Abu-Amero, M. Al-Khtib, A. Lefevre, P. Coullin, G.E. Moore, J. Cavaille, The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta, Hum. Mol. Genet. 19 (2010) 3566–3582.

[9] V. Rippe, G. Belge, M. Meiboom, B. Kazmierczak, A. Fusco, J. Bullerdiek, A KRAB zinc finger protein gene is the potential target of 19q13 translocation in benign thyroid tumors, Genes, Chromosomes Cancer 26 (1999) 229–236.

[10] P.V. Pant, H. Tao, E.J. Beilharz, D.G. Ballinger, D.R. Cox, K.A. Frazer, Analysis of allelic differential expression in human white blood cells, Genome Res. 16 (2006) 331–339.

[11] C. Daelemans, M.E. Ritchie, G. Smits, S. Abu-Amero, I.M. Sudbery, M.S. Forrest, S. Campino, T.G. Clark, P. Stanier, D. Kwiatkowski, P. Deloukas, E.T. Dermitzakis, S. Tavare, G.E. Moore, I. Dunham, High-throughput analysis of candidate imprinted genes and allele-specific gene expression in the human term placenta, BMC Genet. 11 (2010) 25.

[12] J. Ren, P. Jin, E. Wang, F.M. Marincola, D.F. Stroncek, MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cells, J. Transl. Med. 7 (2009) 20.

[13] R.D. Morin, M.D. O'Connor, M. Griffith, F. Kuchenbauer, A. Delaney, A.L. Prabhu, Y. Zhao, H. McDonald, T. Zeng, M. Hirst, C.J. Eaves, M.A. Marra, Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells, Genome Res. 18 (2008) 610–621.

[14] M. Bar, S.K. Wyman, B.R. Fritz, J. Qi, K.S. Garg, R.K. Parkin, E.M. Kroh, A. Bendoraite, P.S. Mitchell, A.M. Nelson, W.L. Ruzzo, C. Ware, J.P. Radich, R. Gentleman, H. Ruohola-Baker, M. Tewari, MicroRNA discovery and profiling in human embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries, Stem cells 26 (2008) 2496–2505.

[15] G. Brooke, T. Rossetti, R. Pelekanos, N. Ilic, P. Murray, S. Hancock, V. Antonenas, G. Huang, D. Gottlieb, K. Bradstock, K. Atkinson, Manufacturing of human placenta-derived mesenchymal stem cells for clinical trials, Br. J. Haematol. 144 (2009) 571–579.

[16] A. Poloni, G. Maurizi, L. Babini, F. Serrani, E. Berardinelli, S. Mancini, B. Costantini, G. Discepoli, P. Leoni, Human Mesenchymal Stem Cells from chorionic villi and amniotic fluid are not susceptible to transformation after extensive in vitro expansion, Cell Transplant. 20 (2010) 643–654.

[17] S. Kadam, S. Muthyala, P. Nair, R. Bhonde, Human placenta-derived mesenchymal stem cells and islet-like cell clusters generated from these cells as a novel source for stem cell therapy in diabetes, Rev. Diabet. Stud. 7 (2010) 168–182.

[18] C.B. Portmann-Lanz, A. Schoeberlein, A. Huber, R. Sager, A. Malek, W. Holzgreve, D.V. Surbek, Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration, Am. J. Obstet. Gynecol. 194 (2006) 664–673.

[19] P.J. Yong, D.E. McFadden, W.P. Robinson, Developmental origin of chorionic villus cultures from spontaneous abortion and chorionic villus sampling, J. Obstet. Gynaecol. Can. 33 (2011) 449–452.

[20] V. Rippe, L. Dittberner, V.N. Lorenz, N. Drieschner, R. Nimzyk, W. Sendt, K. Junker, G. Belge, J. Bullerdiek, The two stem cell microRNA gene clusters C19MC and miR-371-3 are activated by specific chromosomal rearrangements in a subgroup of thyroid adenomas, PLoS One 5 (2010) e9485.

[21] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, Methods 25 (2001) 402–408.

[22] G.S. Songster, L. Sun, S.C. Chang, S.W. Cheung, Chromosome analysis in spontaneous pregnancy loss: use of placental villus mesodermal core cell cultures, Am. J. Med. Genet. 42 (1992) 785–788.

[23] A. Poloni, V. Rosini, E. Mondini, G. Maurizi, S. Mancini, G. Discepoli, S. Biasio, G. Battaglini, E. Berardinelli, F. Serrani, P. Leoni, Characterization and expansion of mesenchymal progenitor cells from first-trimester chorionic villi of human placenta, Cytotherapy 10 (2008) 690–697.

[24] F. Fornari, M. Milazzo, P. Chieco, M. Negrini, E. Marasco, G. Capranico, V. Mantovani, J. Marinello, S. Sabbioni, E. Callegari, M. Cescon, M. Ravaioli, C.M. Croce, L. Bolondi, L. Gramantieri, In hepatocellular carcinoma miR-519d is upregulated by p53 and DNA hypomethylation and targets CDKN1A/p21, PTEN, AKT3 and TIMP2, J. Pathol. (Accepted for publication), doi: 10.1002/path.3995.

[25] T. Tanaka, M. Arai, S. Wu, T. Kanda, H. Miyauchi, F. Imazeki, H. Matsubara, O. Yokosuka, Epigenetic silencing of microRNA-373 plays an important role in regulating cell proliferation in colon cancer, Oncol. Rep. 26 (2011) 1329–1335.

[26] Q. Huang, K. Gumireddy, M. Schrier, C. le Sage, R. Nagel, S. Nair, D.A. Egan, A. Li, G. Huang, A.J. Klein-Szanto, P.A. Gimotty, D. Katsaros, G. Coukos, L. Zhang, E. Pure, R. Agami, The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis, Nat. Cell Biol. 10 (2008) 202–210.

[27] K. Yang, A.M. Handorean, K.A. Iczkowski, MicroRNAs 373 and 520c are downregulated in prostate cancer, suppress CD44 translation and enhance invasion of prostate cancer cells in vitro, Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2 (2009) 361–369.

[28] R. Pijnenborg, L. Vercruysse, M. Hanssens, Fetal-maternal conflict, trophoblast invasion, preeclampsia, and the red queen, Hypertens Pregnancy 27 (2008) 183–196.

[29] P. Liu, M.J. Wilson, MiR-520c and miR-373 upregulate MMP9 expression by targeting mTOR and SIRT1, and activate the Ras/Raf/MEK/Erk signaling pathway and NF-kappaB factor in human fibrosarcoma cells, J. Cell. Physiol. 227 (2012) 867–876.

[30] I. Keklikoglou, C. Koerner, C. Schmidt, J.D. Zhang, D. Heckmann, A. Shavinskaya, H. Allgayer, B. Guckel, T. Fehm, A. Schneeweiss, O. Sahin, S. Wiemann, U. Tschulena, MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF-kappaB and TGF-beta signaling pathways, Oncogene (2011).

[31] R.B. Donker, J.F. Mouillet, T. Chu, C.A. Hubel, D.B. Stolz, A.E. Morelli, Y. Sadovsky, The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes, Mol. Human Reprod. (2012) 1534–1542.

[32] D.D. Taylor, S. Akyol, C. Gercel-Taylor, Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling, J. Immunol. 176 (2006) 1534–1542.

3.5 Publikation V: Exosome-delivered microRNAs of "chromosome 19 microRNA cluster" as immunomodulators in pregnancy and tumorigenesis (Bullerdiek und Flor, 2012).

In dieser Publikation wird eine Hypothese bezüglich der Funktion von C19MC präsentiert.

In Publikation IV wurde gezeigt, dass in der Plazenta auch Zellen des Zottenstromas, also mesenchymale Stamm-/Stromazellen (MSCs), sowie die chorioamniotische Membran, C19MC exprimieren. MSCs aus der Plazenta und der chorioamniotischen Membran weisen eine immunsuppressive Wirkung auf (Bailo et al., 2004; Chang et al., 2006; Magatti et al., 2008; Roelen et al., 2009; Abumaree et al., 2012). Auch von der Plazenta sezernierte Exosomen wirken immunsuppressiv (Frangsmyr et al., 2005; Sabapatha et al., 2006; Taylor et al., 2006; Hedlund et al., 2009; Mincheva-Nilsson und Baranov, 2010; Stenqvist et al., 2013) und enthalten C19MC-miRNAs (Luo et al., 2009; Donker et al., 2012). Diese Tatsachen führten zu der Überlegung, dass C19MC-miRNAs während der Schwangerschaft an der Modulation des mütterlichen Immunsystems und damit der Toleranz gegenüber dem semiallogenen Fetus und der Plazenta beteiligt sein könnten und dass diese Wirkung durch die Sekretion von C19MC-miRNAs enthaltenden Exosomen vermittelt wird.

Auch einige Schilddrüsenadenome exprimieren C19MC (Rippe et al., 2010), jedoch ist bislang nicht bekannt, welche Funktion diese miRNAs dort erfüllen und wie sie zur Tumorgenese beitragen. Allerdings wurde in Publikation I gezeigt, dass sie offenbar keine malignen Funktionen ausüben. Sollten C19MC-miRNAs enthaltende Exosomen eine immunsuppressive Wirkung haben, so könnten sich auch Schilddrüsentumoren (und andere Tumoren), die C19MC überexprimieren, diesen Mechanismus zunutze machen um sich vor Angriffen des Immunsystems zu schützen.

V

Exosome-delivered microRNAs of "chromosome 19 microRNA cluster" as immunomodulators in pregnancy and tumorigenesis

Jörn Bullerdiek und Inga Flor

Molecular Cytogenetics ***5****: 27*

Eigenanteil

- Entwicklung der Hypothese und Verfassen des Manuskripts zusammen mit J. Bullerdiek

Bullerdiek and Flor *Molecular Cytogenetics* 2012, **5**:27
http://www.molecularcytogenetics.org/content/5/1/27

MOLECULAR CYTOGENETICS

HYPOTHESIS Open Access

Exosome-delivered microRNAs of "chromosome 19 microRNA cluster" as immunomodulators in pregnancy and tumorigenesis

Jörn Bullerdiek* and Inga Flor

Abstract

Background: Structural rearrangements of chromosomal band 19q13 are a non-random cytogenetic abnormality in thyroid adenomas and adenomatous goiters and lead to an expression of miRNAs of the chromosome 19 microRNA cluster C19MC. Normally, expression of these miRNAs is silenced except for embryonic stem cells and the placenta where they represent the majority of miRNAs not only in the trophoblast but also in exosomes derived from it.

Presentation of the hypothesis: We have advanced the hypothesis that as part of the feto-maternal communication miRNAs of C19MC serve immunomodulatory functions in the placenta and confer a growth advantage to thyroid nodules by protecting them against autoimmune attacks. More precisely, the exosomes containing these miRNAs may specifically target immune cells in their local environment as well as systemically by transferring their cargo to recipient cells. Within these target cells the transferred miRNAs can interact with mRNAs of the recipient cells thereby suppressing their immune-specific functions.

Testing the hypothesis: Experiments used to demonstrate the immunomodulatory capacity of placenta-derived exosomes can be modified by transfecting the target cells with those miRNAs of C19MC represented in placental exosomes.

Implications of the hypothesis: Mimics of C19MC-derived miRNAs might develop to useful drug candidates for the treatment of autoimmune disease as e.g. rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome and for the prevention of transplant rejection. In case of tumor entities with elevated expression of C19MC miRNAs these miRNAs may be interesting targets for treatment with appropriate antagonists.

Keywords: MicroRNA, Chromosomal translocation, Thyroid adenoma, C19MC, Placenta, Epigenetics, Immunomodulation

Background

First being described in 1989 [1], structural rearrangements of chromosomal band 19q13 are a frequent non-random cytogenetic abnormality in thyroid adenomas and adenomatous goiters. By applying molecular-cytogenetic methods on established cell lines it was possible to narrow down the breakpoints to a region of about 150 kbp [2] which was later shown to harbor C19MC (chromosome 19 microRNA cluster), the largest human microRNA cluster at all [3] (Figure 1). As a rule, by the chromosomal rearrangements the microRNAs of this cluster and the neighboring miR-371-3 cluster become strongly upregulated [4]. Of these both clusters C19MC is remarkable not only because of its sheer size encoding more than 50 mature microRNAs but also because of its "young" age. The whole cluster is primate-specific [3] and thus must have evolved within a relatively short time in terms of evolution. Normally, the miRNAs of C19MC are expressed almost exclusively in embryonic stem cells [5-9] and, later during embryonic and fetal development, only in the placenta [3,10]. Luo et al. [11] demonstrated that the trophoblast secretes exosomes, i.e. small membrane microvesicles, which contain placenta-specific miRNAs. Moreover, it was demonstrated quite recently that the vast majority of miRNAs packed into placenta-derived exosomes consist of

* Correspondence: bullerd@uni-bremen.de
Center for Human Genetics, University of Bremen, Leobener Str. ZHG, Bremen 28359, Germany

BioMed Central

© 2012 Bullerdiek and Flor; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Bullerdiek and Flor *Molecular Cytogenetics* 2012, **5**:27
http://www.molecularcytogenetics.org/content/5/1/27

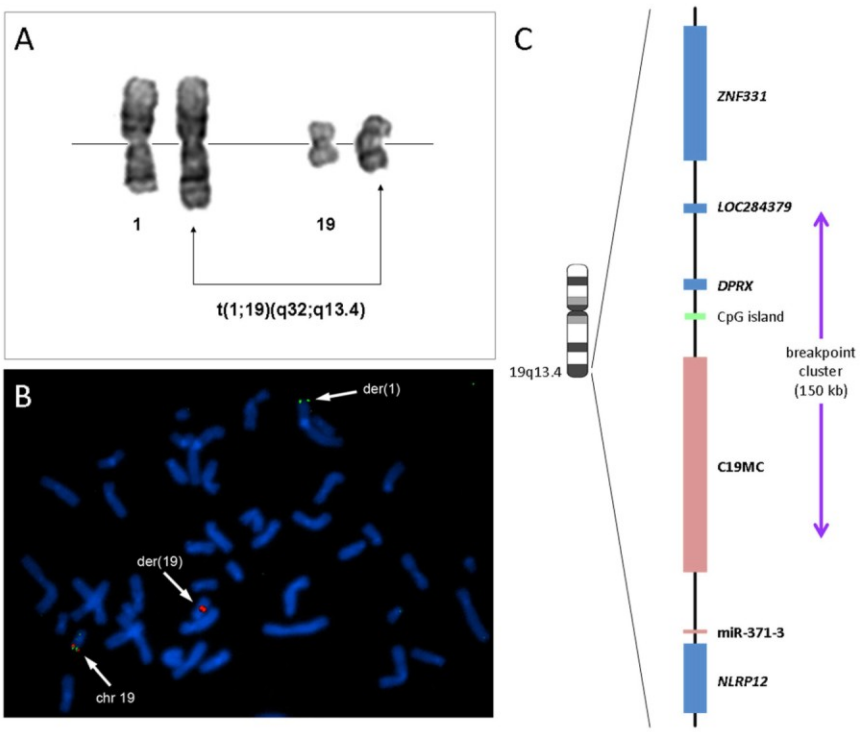

Figure 1 (A) Partial karyotype of an adenoma with an apparently balanced translocation t(1;19)(q32;q13.4) is shown as an example of adenomas with a 19q13.4 chromosomal rearrangement. (B) Metaphase of a thyroid adenoma with a t(1;19)(q32;q13.4) after FISH with dual-color break-apart rearrangement probe appropriate for the detection of 19q13.4 rearrangements. The 19q13.4 rearrangement is indicated by one single green and one single red signal each. (C) The chromosomal region 19q13.4 with the miRNA clusters C19MC and miR-371-3 (pink boxes) and surrounding protein-coding genes (blue boxes). The common breakpoint cluster of thyroid adenomas and adenomatous goiters is indicated by an arrow.

miRNAs of the C19MC cluster [12]. However, in both cases, i.e. in the placenta or after chromosomal translocations in benign thyroid nodules, the exact mechanisms by which C19MC miRNAs contribute to normal or aberrant functions, respectively, remain obscure.

Herein, we shall advance the hypothesis that as part of the feto-maternal communication miRNAs of C19MC serve immunomodulatory functions in the placenta and, once re-expressed due to chromosomal translocations, confer a growth advantage to thyroid nodules by protecting them against autoimmune attacks.

Presentation of the hypothesis

Though cytogenetic aberrations of 19q13.4 as detected in benign thyroid lesions represent one of the most common specific chromosomal alterations in epithelial tumors at all the molecular mechanisms resulting from these frequent genomic alterations still remain obscure. As to tumorigenesis, the stimulation of invasive growth has been attributed to some miRNAs of C19MC [for review see 13] but the activation of the cluster in thyroid adenomas and nodular goiters with 19q13.4 alterations apparently does not coincide with invasive growth. Thus, it seems unlikely that in general activation of C19MC leads to invasive growth or other features characterizing malignant cells. On the other hand, presumed "physiological functions" of its miRNAs might give us a clue to understand their role in tumorigenesis. Of note, until birth expression of C19MC persists only in the placenta or, more precisely, its trophoblast [10,11], and is expressed exclusively from the paternal allele whereas the maternal allele is silenced by epigenetic modification [14].

In general, miRNAs do not necessarily exert their main functions in the cells they are expressed in since considerable amounts of miRNAs can become packed into microvesicles called exosomes. Exosomes are bioactive vesicles derived from endosomal membranes and involved in intercellular communication by their specific cargos of proteins, mRNAs, and miRNAs [for review see 15]. In previous reports placenta-derived exosomes have been demonstrated to interact with immune cells, e.g. resulting in suppression of T-cell signaling components [16,17].

Donker et al. [12] were able to demonstrate recently that the cellular miRNA composition of human primary trophoblast cells strongly resembled that of the exosomes secreted from these cells. In both cases those of C19MC represented the majority of mature miRNAs. Of note, six microRNAs of C19MC ranged among the top-ten exosomal miRNAs. Based on their findings the authors have assumed that these miRNAs "may play an important role in placental-maternal communication, possibly directing maternal adaptation to pregnancy."

Herein, we would like to outline the hypothesis that as one major function miRNAs of C19MC prevent the embryo from being attacked by the maternal immune system. Immunologically, the embryo is considered being a semi-allograft and in case of egg donation even a full allograft [18]. Nevertheless, the embryo efficiently avoids rejection by its mother's immune system by mechanisms that are not fully understood yet [for review see 19]. Exosomes are known to share membrane characteristics with the cells they are derived from [20]. Thus, it seems tempting to assume that they act like decoy-flairs for a jet. The exosomes can specifically target immune cells in their local environment, i.e. the decidua, as well as systemically thereby transferring their cargo when melting with the membrane of recipient cells. Within these target cells the transferred miRNAs can interact with mRNAs of the recipient cells thereby modulating post-transcriptional regulation. Non-specific systemic side effects of this mechanism may be the mild immunosuppression noted during pregnancy e.g. leading to the improvement of rheumatoid arthritis [for review see 21].

Tracing back to nodular goiters and thyroid adenomas re-expression of C19MC may protect cells against autoimmune attacks. Of note, a considerable percentage of these lesions develop after a pre-existing autoimmune disease of the thyroid.

Finally, the question arises if malignant tumors can adopt this mechanism to protect themselves. 19q13 is one of the most frequent chromosomal breakpoints identified in human tumors and even if, in particular in case of complex karyotypic aberrations, the small size of chromosome 19 may have resulted in false positive identification of this breakpoint there remain a number of tumor entities where its involvement has been identified unambiguously as e.g. hamartoma of the liver [22,23]. Also, a number of recent papers point to the role of amplification (e. g. in CNS-PNET [24] and in embryonal brain tumors with ependymoblastic multilayered rosettes [25]) or undermethylation of the C19MC locus (e. g. in hepatocellular carcinomas [26,27]) in several tumor entities.

Testing the hypothesis

There are straightforward appropriate experimental approaches to test our hypothesis. Nevertheless, these approaches are time consuming because not all miRNAs of the cluster may have the capacity to modulate immune cells and because different types of immune cells have to be tested. As a first step the same experiments used to demonstrate the immunomodulatory capacity of placenta-derived exosomes [e.g. 17] can be modified by transfecting the target cells with those miRNAs of C19MC highly represented in placental exosomes. Furthermore, it did not escape our attention that mesenchymal cells from the amniotic membrane have strong immunomodulatory properties, e.g. by actively suppressing T-cell proliferation induced by alloantigens [28]. So far, it is believed that at term only the trophoblast expresses C19MC miRNAs but if our hypothesis holds true one would expect that these amniotic-membrane derived cells do so as well.

Implications of the hypothesis

If the hypothesis holds true it will be not only relevant in terms of basic science but also for several clinical approaches. Mimics of C19MC-derived miRNAs, either encapsulated or not, might develop to useful drug candidates for the treatment of autoimmune disease as e.g. rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome. Likewise, these miRNAs may prolong the maintenance of functional allografts. On the other hand, in case of tumor entities with forced expression of C19MC miRNAs their antagonists may represent interesting alternatives for targeted treatments.

Abbreviations

C19MC: chromosome 19 microRNA cluster; CNS-PNET: Central nervous system primitive neuroectodermal tumor; miRNA: microRNA.

Competing interests

The authors declare competing financial interests because the University of Bremen is currently applying for a patent claiming the use of C19MC miRNAs for immunomodulation.

Authors' contributions

Both authors have equally contributed to this hypothesis and written the manuscript. Both authors read and approved the final manuscript.

Received: 5 April 2012 Accepted: 6 May 2012
Published: 6 May 2012

References

1. Bartnitzke S, Herrmann ME, Lobeck H, Zuschneid W, Neuhaus P, Bullerdiek J: **Cytogenetic findings on eight follicular thyroid adenomas including one with a t(10;19).** *Canc Genet Cytogenet* 1989, **39:**65–68.
2. Belge G, Rippe V, Meiboom M, Drieschner N, Garcia E, Bullerdiek J: **Delineation of a 150-kb breakpoint cluster in benign thyroid tumors with 19q13.4 aberrations.** *Cytogenet Cell Genet* 2001, **93:**48–51.
3. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, *et al*: **Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs.** *Nat Genet* 2005, **37:**766–770.
4. Rippe V, Dittberner L, Lorenz VN, Drieschner N, Nimzyk R, Sendt W, Junker K, Belge G, Bullerdiek J: **The two stem cell microRNA gene clusters C19MC and miR-371-3 are activated by specific chromosomal rearrangements in a subgroup of thyroid adenomas.** *PLoS One* 2010, **5:**e9485.
5. Bar M, Wyman SK, Fritz BR, Qi J, Garg KS, Parkin RK, Kroh EM, Bendoraite A, Mitchell PS, Nelson AM, *et al*: **MicroRNA discovery and profiling in human**

embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries. *Stem Cell* 2008, **26:**2496–2505.
6. Laurent LC, Chen J, Ulitsky I, Mueller FJ, Lu C, Shamir R, Fan JB, Loring JF: **Comprehensive microRNA profiling reveals a unique human embryonic stem cell signature dominated by a single seed sequence.** *Stem Cell* 2008, **26:**1506–1516.
7. Morin RD, O'Connor MD, Griffith M, Kuchenbauer F, Delaney A, Prabhu AL, Zhao Y, McDonald H, Zeng T, Hirst M, *et al*: **Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells.** *Genome Res* 2008, **18:**610–621.
8. Ren J, Jin P, Wang E, Marincola FM, Stroncek DF: **MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cells.** *J Transl Med* 2009, **7:**20.
9. Cao H, Yang CS, Rana TM: **Evolutionary emergence of microRNAs in human embryonic stem cells.** *PLoS One* 2008, **3:**e2820.
10. Zhang R, Wang YQ, Su B: **Molecular evolution of a primate-specific microRNA family.** *Mol Biol Evol* 2008, **25:**1493–1502.
11. Luo SS, Ishibashi O, Ishikawa G, Ishikawa T, Katayama A, Mishima T, Takizawa T, Shigihara T, Goto T, Izumi A, *et al*: **Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes.** *Biol Reprod* 2009, **81:**717–729.
12. Donker RB, Mouillet JF, Chu T, Hubel CA, Stolz DB, Morelli AE, Sadovsky Y: **The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes.** *Mol Human Reprod* 2012. doi:10.1093/molehr/gas013. "Accepted Article".
13. Flor I, Bullerdiek J: **The dark side of a success story: microRNAs of the C19MC cluster in human tumours.** *J Pathol* 2012. doi:10.1002/path.4014. "Accepted Article".
14. Noguer-Dance M, Abu-Amero S, Al-Khtib M, Lefevre A, Coullin P, Moore GE, Cavaille J: **The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta.** *Hum Mol Genet* 2010, **19:**3566–3582.
15. Pant S, Hilton H, Burczynski ME: **The multifaceted exosome: Biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities.** *Biochem Pharmacol* 2012, **83:**1484–1494.
16. Taylor DD, Akyol S, Gercel-Taylor C: **Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling.** *J Immunol* 2006, **176:**1534–1542.
17. Sabapatha A, Gercel-Taylor C, Taylor DD: **Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences.** *Am J Reprod Immunol* 2006, **56:**345–355.
18. van der Hoorn ML, Scherjon SA, Claas FH: **Egg donation pregnancy as an immunological model for solid organ transplantation.** *Transplant Immunol* 2011, **25:**89–95.
19. Warning JC, McCracken SA, Morris JM: **A balancing act: mechanisms by which the fetus avoids rejection by the maternal immune system.** *Reproduction* 2011, **141:**715–724.
20. Mincheva-Nilsson L, Baranov V: **The role of placental exosomes in reproduction.** *Am J Reprod Immunol* 2010, **63:**520–533.
21. Ostensen M, Villiger PM, Forger F: **Interaction of pregnancy and autoimmune rheumatic disease.** *Autoimmun Rev* 2012, **11:**A437–A446.
22. Speleman F, De Telder V, De Potter KR, Dal Cin P, Van Daele S, Benoit Y, Leroy JG, Van den Berghe H: **Cytogenetic analysis of a mesenchymal hamartoma of the liver.** *Canc Genet Cytogenet* 1989, **40:**29–32.
23. Rajaram V, Knezevich S, Bove KE, Perry A, Pfeifer JD: **DNA sequence of the translocation breakpoints in undifferentiated embryonal sarcoma arising in mesenchymal hamartoma of the liver harboring the t(11;19)(q11; q13.4) translocation.** *Genes Chromosomes Canc* 2007, **46:**508–513.
24. Li M, Lee KF, Lu Y, Clarke I, Shih D, Eberhart C, Collins VP, Van Meter T, Picard D, Zhou L, *et al*: **Frequent amplification of a chr19q13.41 microRNA polycistron in aggressive primitive neuroectodermal brain tumors.** *Canc Cell* 2009, **16:**533–546.
25. Nobusawa S, Yokoo H, Hirato J, Kakita A, Takahashi H, Sugino T, Tasaki K, Itoh H, Hatori T, Shimoyama Y, *et al*: **Analysis of Chromosome 19q13.42 Amplification in Embryonal Brain Tumors with Ependymoblastic Multilayered Rosettes.** *Brain Pathol* 2012. doi:10.1111/j.1750-3639.2012.00574.x. "Accepted Article".
26. Fornari F, Milazzo M, Chieco P, Negrini M, Marasco E, Capranico G, Mantovani V, Marinello J, Sabbioni S, Callegari E, *et al*: **In hepatocellular carcinoma miR-519d is upregulated by p53 and DNA hypomethylation and targets CDKN1A/p21, PTEN, AKT3 and TIMP2.** *J Pathol* 2012. doi:10.1002/path.3995. "Accepted Article".
27. Augello C, Vaira V, Caruso L, Destro A, Maggioni M, Park YN, Montorsi M, Santambrogio R, Roncalli M, Bosari S: **MicroRNA profiling of hepatocarcinogenesis identifies C19MC cluster as a novel prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma.** *Liver Int* 2012, **32:**772–782.
28. Wolbank S, Peterbauer A, Fahrner M, Hennerbichler S, van Griensven M, Stadler G, Redl H, Gabriel C: **Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue.** *Tissue Eng* 2007, **13:**1173–1183.

doi:10.1186/1755-8166-5-27
Cite this article as: Bullerdiek and Flor: Exosome-delivered microRNAs of "chromosome 19 microRNA cluster" as immunomodulators in pregnancy and tumorigenesis. *Molecular Cytogenetics* 2012 **5**:27.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

4 Diskussion

miRNAs spielen als posttranskriptionelle Genregulatoren eine wichtige Rolle in diversen zellulären Prozessen. Fehlsteuerungen in der Expression von miRNAs können daher weitreichende Folgen haben. Dementsprechend wurde die aberrante Expression von miRNAs mit verschiedensten Tumoren und anderen Erkrankungen in Verbindung gebracht.

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der miRNA-Cluster C19MC und miR-371-3, welche physiologischerweise in embryonalen Stammzellen (Bar et al., 2008; Cao et al., 2008; Laurent et al., 2008; Morin et al., 2008; Ren et al., 2009) und der Plazenta (Bentwich et al., 2005; Liang et al., 2007; Bortolin-Cavaillé et al., 2009; Tsai et al., 2009) exprimiert werden, die aber auch mit der Entstehung verschiedener Tumoren in Verbindung gebracht wurden, darunter testikuläre Keimzelltumoren (Gillis et al., 2007; Murray et al., 2010; Palmer et al., 2010; Bing et al., 2012; Dieckmann et al., 2012; Novotny et al., 2012) und Schilddrüsenadenome (Rippe et al., 2010).

Noduläre Veränderungen der Schilddrüse betreffen in Deutschland ungefähr jeden dritten Erwachsenen. Dies ist damit die häufigste endokrine Erkrankung in Deutschland (Karger et al., 2006). Bei diesen Veränderungen kann es sich sowohl um hyperplastische oder adenomatöse Strumaknoten als auch um benigne oder maligne Tumoren handeln (Schmid, 1997). Die überwiegende Mehrheit (80–90 %) der Tumoren sind follikuläre Adenome (Perren et al., 2008). In ca. 9 % der Schilddrüsenadenome liegt eine Translokation unter Beteiligung der Chromosomenbande 19q13.4 vor (Belge et al., 1998), welche die Aktivierung der dort lokalisierten miRNA-Cluster C19MC und miR-371-3 bewirkt (Rippe et al., 2010). Deren Rolle bei der Tumorgenese von Schilddrüsenadenomen ist bislang unklar. Da diese miRNAs aber mit verschiedenen malignen Funktionen wie Invasion und Migration in Verbindung gebracht wurden (Huang et al., 2008; Yu et al., 2008; Yang et al., 2009; Cairo et al., 2010; Su et al., 2010; Toffanin et al., 2011; Yan et al., 2011; Fornari et al., 2012; Liu und Wilson, 2012; Zhou et al., 2012a), wäre es denkbar, dass die Expression von C19MC und miR-371-3 in Schilddrüsenepithelzellen bzw. Schilddrüsenadenomen einen ersten Schritt zur malignen Entartung darstellt bzw. die Zellen zur malignen Transformation prädisponiert.

Zumindest für follikuläre Schilddrüsenkarzinome (FTC) wurde eine Entwicklung aus follikulären Adenomen (FA) postuliert (Adenom-Karzinom-Sequenz) (Arora et al.,

2008), da FTC ebenso wie FA *RAS*-Mutationen (in 30–50 % der Fälle) sowie *PAX8/PPARG*-Rearrangements (25–56 %) aufweisen (Karger et al., 2006) und sich auch andere genetische Veränderungen wie die Deregulation des Transkriptionsfaktors FOXO3 sowohl bei FTC als auch bei FA finden. Es wird daher von einigen Autoren vermutet, dass zumindest in manchen FA ein malignes Potential vorhanden ist (Arora et al., 2008; Schmid, 2010). Ein solches malignes Potential könnte auch in der Expression von C19MC und miR-371-3 bestehen.

Bisher wurde die Expression von C19MC und miR-371-3 nur in Schilddrüsenadenomen untersucht (Rippe et al., 2010). Sollte aber ein durch die Expression von C19MC- und miR-371-3 bedingtes malignes Potential bestehen, müsste sich deren Überexpression auch in einigen Schilddrüsenkarzinomen feststellen lassen. Daher wurden insgesamt 114 Schilddrüsenkarzinome auf die Expression von miR-371-3 und C19MC hin untersucht. Es konnte lediglich bei zwei Proben, einem PTC und einem ATC, eine geringe Erhöhung von miR-372-3p und miR-371a-3p festgestellt werden, die allerdings nicht mit einer Erhöhung der C19MC-miRNAs einherging. Bei diesen Fällen konnte auch keine 19q13.4-Translokation festgestellt werden (Rippe et al., 2012). Die Ergebnisse liefern daher keinerlei Hinweise darauf, dass die Expression von C19MC und miR-371-3 in follikulären Schilddrüsenzellen bzw. -adenomen eine Prädisposition für maligne Entartung darstellt bzw. diesen maligne Eigenschaften verleiht. Dementsprechend scheint auch die Entstehung eines FTC aus zumindest dieser Untergruppe von FA im Sinne einer Adenom-Karzinom-Sequenz unwahrscheinlich.

Eine weitere Tumorentität, die in dieser Dissertation untersucht wurde, sind testikuläre Keimzelltumoren (TGCTs). Hodentumoren machen zwar nur ca. 1,5 % der Krebserkrankungen erwachsener Männer in Deutschland aus, sind aber in der Altersgruppe von 25–45 Jahren die häufigsten malignen Tumoren (*Krebs in Deutschland 2009/2010*, 2013). Die Inzidenz von Hodentumoren schwankt beträchtlich geographisch und nach ethnischer Herkunft. Die höchsten (altersstandardisierten) Inzidenzen mit 8–10/100.000 gibt es in Norwegen, Dänemark, Deutschland, der Schweiz und Ungarn (Woodward et al., 2004). In der Altersgruppe von 25–34 Jahren erkranken in Deutschland im Jahr sogar 20/100.000 Männern. Die Inzidenz hat in den letzten Jahrzehnten deutlich zugenommen, mit jährlichen Steigerungsraten von 3–5 % in den Ländern Nord- und Mitteleuropas (Mikuz, 2014). In dieser Arbeit wurde die Expression von C19MC in insgesamt 25

TGCTs unterschiedlicher Histologie und klinischer Stadien untersucht. Außerdem wurde die Expression in Hoden-Normalgewebe mit anderen adulten Normalgeweben verglichen. Im Hoden-Normalgewebe wurden für die untersuchten C19MC-miRNAs deutlich höhere Expressionswerte als in anderen normalen adulten Geweben gemessen (Flor et al., im Druck). Die Expression von C19MC wird von einer CpG-Insel beeinflusst, welche parentalem Imprinting unterliegt (Tsai et al., 2009; Noguer-Dance et al., 2010). In Vorläuferkeimzellen wird das Imprinting-Muster gelöscht, d. h. Imprinting-Gene sind demethyliert (Sasaki und Matsui, 2008; Cedar und Bergman, 2012). Die meisten Imprinting-Gene werden während der Oogenese *de novo* methyliert, bleiben jedoch während der Spermatogenese unmethyliert (Cedar und Bergman, 2012). Tatsächlich haben Noguer-Dance et al. (2010) gezeigt, dass die C19MC-CpG-Insel in Spermien unmethyliert (in Oozyten hingegen methyliert) ist. Da Keimzellen in unterschiedlichen Reifegraden von Spermatogonien bis zu Spermien den Hauptanteil an Zellen im Hodengewebe bilden (Haider, 2010), ist anzunehmen, dass die hohe Expression von C19MC in Hodengewebe von den Keimzellen herrührt, in denen die C19MC-GpG-Insel unmethyliert ist.

In den untersuchten TGCTs wurde eine differentielle Expression von C19MC abhängig von Tumortyp und -stadium festgestellt, d. h. eine erhöhte Expression im Vergleich zu Hodennormalgewebe wurde bei Nicht-Seminomen und in höheren klinischen Stadien (unabhängig vom Tumortyp) gemessen (Flor et al., im Druck). C19MC verhält sich damit in TGCTs anders als miR-371-3, bei dem generell eine Überexpression in TGCTs (außer in Teratomen) festgestellt wurde (Voorhoeve et al., 2006; Gillis et al., 2007; Murray et al., 2010; Palmer et al., 2010; Bing et al., 2012; Dieckmann et al., 2012; Novotny et al., 2012). Nicht-Seminome sind in ihrem Verhalten generell aggressiver als Seminome, das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 25, bei Seminomen hingegen bei 35 Jahren (Oosterhuis und Looijenga, 2005). Die klinischen Stadien 2 und 3 sind dadurch charakterisiert, dass bei ihnen bereits Metastasen in nahegelegenen (Stadium 2) bzw. entfernten Lymphknoten oder anderen Organen (Stadium 3) vorhanden sind. Die erhöhte Expression von C19MC-miRNAs ist also mit einem aggressiveren Phänotyp der Tumoren verknüpft. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass C19MC in TGCTs an der Verleihung maligner Eigenschaften beteiligt sein könnte und bspw. die Fähigkeit zur Metastasierung fördert.

TGCTs können nach ihrer Epidemiologie, klinischem Verhalten, Histologie und chromosomaler Konstitution in drei Untergruppen eingeteilt werden (Woodward et al., 2004). Die bei Jugendlichen und jüngeren Männern auftretenden TGCTs werden dem Typ II zugeordnet (Oosterhuis und Looijenga, 2005). Man geht davon aus, dass alle Typ II-TGCTs aus einer gemeinsamen Vorläuferläsion, im deutschen Sprachraum meist TIN (testikuläre intraepitheliale Neoplasie) genannt, hervorgehen. Diese wiederum entwickelt sich aus einer Vorläuferkeimzelle, deren Reifung noch während der Embryonalentwicklung blockiert wird, woraufhin möglicherweise bereits während dieser Phase erste Schritte der malignen Transformation ablaufen. Wahrscheinlich ausgelöst durch Änderungen im Hormonhaushalt mit Einsetzen der Pubertät werden weitere Veränderungen induziert, so dass schließlich die eigentlichen TINs entstehen (Rajpert-De Meyts, 2006). Wie oben beschrieben ist das Imprinting-Muster in Vorläuferkeimzellen gelöscht (Sasaki und Matsui, 2008; Cedar und Bergman, 2012). Ihrer Abstammung aus Vorläuferzellen entsprechend ist das Imprinting-Muster auch in TGCTs (vom Typ II) gelöscht (Looijenga et al., 1999; Oosterhuis und Looijenga, 2005), d. h. CpG-Inseln von Imprinting-Genen sind demethyliert (Okamoto, 2012). Auch TINs zeigen stets eine starke Hypomethylierung (Almstrup et al., 2011). Die Expression von C19MC in TGCT reflektiert demnach wahrscheinlich die Herkunft des Tumors aus den Vorläuferkeimzellen. Auch bei TINs wurde eine Expression von C19MC-miRNAs auf Niveau von Hodennormalgewebe und Seminomen festgestellt (Novotny et al., 2012).

Dem gängigen Modell zufolge entwickelt sich aus einer TIN in der Regel entweder ein Seminom oder ein embryonales Karzinom, obwohl auch die Entstehung eines embryonalen Karzinoms aus einem Seminom und umgekehrt diskutiert wird (Oosterhuis und Looijenga, 2005; Miyai et al., 2013; Boublikova et al., 2014). Alle anderen Nicht-Seminome entwickeln sich abhängig vom Pfad und Grad der Differenzierung aus den pluripotenten embryonalen Karzinomen (McIntyre et al., 2008). Bei embryonaler Differenzierung entsteht ein Teratom, bei extraembryonaler Differenzierung ein Dottersacktumor oder ein Chorionkarzinom (Wittekind, 2008). Die festgestellten C19MC-Expressionsunterschiede in den verschiedenen Tumortypen sind möglicherweise durch den eingeschlagenen Differenzierungspfad sowie durch andere während der Tumorprogression stattfindende, noch ungeklärte, Prozesse bedingt. Im Falle der niedrigeren Expression in Teratomen als in

Hodennormalgeweben, könnte dies z.B. die *de novo*-Methylierung im Zuge der somatischen Differenzierung sein.

Eine weitere Frage bei der Untersuchung von TGCTs war, ob sich C19MC-miRNAs auch als Tumormarker eignen. miRNAs sind aufgrund ihrer hohen Stabilität in Körperflüssigkeiten als non-invasive Biomarker, mit deren Hilfe Erkrankungen oder körperliche Zustände diagnostiziert oder überwacht werden können, sehr vielversprechend. Das Potential von miR-371-3, und hier insbesondere von miR-371a-3p, als Tumormarker für TGCTs wurde bereits in mehreren Publikationen gezeigt (Murray et al., 2011; Belge et al., 2012; Dieckmann et al., 2012; Murray und Coleman, 2012; Gillis et al., 2013; Rijlaarsdam et al., 2015; Spiekermann et al., 2015; Syring et al., 2015). Ein geeigneter Tumormarker sollte bei Patienten erhöht sein und nach Abschluss der Therapie das Niveau von Kontrollpersonen erreichen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass miR-517a-3p im Serum von Patienten analog zum Zustand im Tumorgewebe erhöht ist, d. h. bei den meisten Nicht-Seminom-Patienten im klinischen Stadium 1 und bei allen Seminom- und Nicht-Seminom-Patienten in den klinischen Stadien 2 und 3. Die Level der Patienten in Stadium 2 und 3 waren zudem signifikant höher als die der Patienten in Stadium 1. Nach der OP fielen die Serumwerte bei den Patienten im Stadium 1 direkt auf Kontrollniveau, bei den Patienten in Stadium 2 und 3 blieben die Werte teilweise noch über Kontrollniveau (Flor et al., im Druck). Die erhöhten Ausgangswerte und die nach der OP erhöht bleibenden Werte bei Patienten im Stadium 2 und 3 dürften auf die höhere Tumorlast durch die Metastasen bzw. durch die nach der OP noch vorhandenen Metastasen bedingt sein. Insgesamt liefert diese Studie erste Hinweise, dass miR-517a-3p als Tumormarker für bestimmte Typen von TGCTs (möglicherweise in Kombination mit miR-371a-3p) geeignet sein könnte. Weitere Untersuchungen, u. a. des Verlaufs des Serumlevels bis zum Abschluss der Therapie bei Patienten im Stadium 2 und 3, sind notwendig. Zudem sollten auch andere C19MC-miRNAs auf ihre Eignung hin überprüft werden.

Bezüglich der Funktionen von C19MC und miR-371-3 geht aus der ersten Publikation dieser Arbeit hervor, dass beide Cluster Schilddrüsentumoren offenbar keine malignen Fähigkeiten verleihen, da sie ausschließlich in den benignen Schilddrüsenadenomen (Rippe et al., 2010), nicht aber in den malignen Schilddrüsenkarzinomen (Rippe et al., 2012) exprimiert werden. Hingegen ist in TGCTs eine erhöhte C19MC-Expression mit aggressiveren Tumoren (Tumoren

höheren Stadiums und Nicht-Seminome) und damit einer erhöhten Malignität verknüpft (Flor et al., im Druck). Für miR-371-3 wurde dies bisher nicht beobachtet, sondern dieses Cluster ist in TGCTs generell und damit unabhängig von der unterschiedlichen Aggressivität der Tumortypen überexprimiert. miR-371-3 wurde jedoch in verschiedenen Untersuchungen mit erhöhter Proliferation in Verbindung gebracht (Voorhoeve et al., 2006; Lee et al., 2009; Qi et al., 2009; Wu et al., 2010; Wu et al., 2011; Yamashita et al., 2012; Zhou et al., 2012b; Liu et al., 2013; Zhang et al., 2013) und könnte diese sowohl in Schilddrüsenadenomen als auch in TGCTs fördern.

Zumindest C19MC hat offenbar in den beiden Tumorentitäten einen unterschiedlichen Einfluss. Solche unterschiedlichen und teilweise konträren Wirkungen sind, wie in der Einleitung dargestellt und auch in Publikation III (Flor und Bullerdiek, 2012) thematisiert wurde, auch in anderen Tumorentitäten festgestellt worden und sind offenbar im Zelltyp bzw. -kontext begründet. Dies wird anschaulich durch Untersuchungen einer Arbeitsgruppe demonstriert, die sich mit den Funktionen von miR-520c-3p und miR-373-3p befasst hat. In einer ersten Publikation (Liu und Wilson, 2012) wurde gezeigt, dass die beiden miRNAs in der Fibrosarkomzelllinie HT1080 *MTOR* und *SIRT1* herunterregulieren, was wiederum zur Aktivierung des RAS/RAF/MEK/ERK- und des NF-κB-Signalwegs führt und letztlich die erhöhte Expression und Aktivität der Matrix-Metalloproteinase MMP9 bewirkt. Matrix-Metalloproteinasen spielen beim Gewebeumbau eine wichtige Rolle, indem sie die extrazelluläre Matrix proteolytisch abbauen. Sie sind so auch an invasivem Wachstum und Angiogenese beteiligt (Brown und Murray, 2015). miR-520c-3p und miR-373-3p bewirkten damit in der Zelllinie HT1080 eine gesteigerte Migrationsfähigkeit (Liu und Wilson, 2012). In einer zweiten Publikation (Lu et al., 2015) untersuchte die Arbeitsgruppe weitere Zelllinien (die humane Gliom-Zelllinie U87GM und die Prostataepithel-Zelllinie BPH-1) und zeigte, dass *MMP14* ebenfalls ein Zielgen von miR-520c-3p und miR-373-3p ist. MMP14 wiederum ist ein Aktivator der Matrix-Metalloproteinase MMP2. miR-520c-3p und miR-373-3p verhindern somit eine Aktivierung von MMP2 und hemmen dadurch die Migrationsfähigkeit der Zellen. In den hier untersuchten Zelllinien konnte keine Hochregulation von MMP9 nachgewiesen werden (Lu et al., 2015), wie es für HT1080 der Fall gewesen war (Liu und Wilson, 2012). Es stehen sich hier also in unterschiedlichen Zelllinien zwei gegensätzliche Effekte von miR-373-3p und miR-520c-3p gegenüber. Weitere

Untersuchungen zeigten, dass miR-373-3p und miR-520c-3p ihren fördernden Einfluss auf die Expression von MMP9 nur in Zellen ausüben, in denen bereits MMP9 exprimiert wird, jedoch nicht in Zellen ohne endogene MMP9-Expression. In erstgenannten Zellen überwiegt offenbar der Effekt der Hochregulation von MMP9 den der Herunterregulation von MMP2, woraus in der Summe ein migrationssteigernder Effekt resultiert. In Zellen ohne endogene MMP9-Expression bewirkt die alleinige Herunterregulation von MMP2 (ohne die gleichzeitige Heraufregulation von MMP9) einen migrationshemmenden Effekt (Lu et al., 2015).
Dieses Beispiel macht deutlich, welch entscheidende Rolle der Zelltyp bzw. -kontext spielt. Ob in der Zelle ein bestimmter Signalweg aktiviert ist oder ein potentielles Zielgen überhaupt exprimiert wird, ist ausschlaggebend für die Wirkung, die eine miRNA entfaltet. Abhängig davon kann die gleiche miRNA in verschiedenen Tumor- bzw. Zelltypen einen onkogenen oder einen tumorsuppressiven Einfluss ausüben. Im Falle der gleichzeitigen Hochregulation aller miRNAs von C19MC und miR-371-3 kommt noch die große Anzahl an deregulierten miRNAs hinzu. C19MC codiert als größtes menschliches miRNA-Cluster für 62 reife miRNAs, miR-371-3 für sechs. Durch die aberrante Expression aller dieser miRNAs ergeben sich hochkomplexe Wechselwirkungen, deren Effekt in der Summe wiederum vom zellulären Kontext abhängig ist.
Um Hinweise auf die natürliche Funktion von C19MC zu erhalten, wurde in dieser Arbeit als nächstes die Plazenta, in der C19MC unter physiologischen Bedingungen exprimiert wird (Bentwich et al., 2005; Liang et al., 2007; Bortolin-Cavaillé et al., 2009; Tsai et al., 2009) näher untersucht. Dazu wurden MSCs aus Langzeitkulturen von Chorionzottenbiopsien der 10.–14. SSW und aus Langzeitkulturen einer reifen Plazenta sowie FFPE-Gewebe von Plazenta und chorioamniotischer Membran der gleichen Plazenta untersucht. Erwartungsgemäß wies das FFPE-Plazentagewebe eine hohe Expression aller C19MC miRNAs auf. Auch in der chorioamniotischen Membran wurden sehr hohe Expressionslevel auf einem vergleichbaren Niveau gemessen. Im Widerspruch zu anderen Publikationen (Zhang et al., 2008; Luo et al., 2009), laut denen C19MC innerhalb der Plazenta primär im Synzytiotrophoblasten und nicht im Chorionzotten-Stroma exprimiert wird, wurde auch in den MSCs (sowohl der jungen als auch der reifen Plazenta) eine hohe, d. h. zu nativer Plazenta vergleichbare, Expression von C19MC miRNAs festgestellt. Der Methylierungsstatus

der kultivierten MSCs entsprach zudem dem von nativer Plazenta, was gegen eine Zellkultur-bedingte artifizielle Hochregulation des Clusters spricht (Flor et al., 2012).
Diese abweichenden Ergebnisse könnten durch die von Zhang et al. (2008) und Luo et al. (2009) verwendete Methode bedingt sein. In deren Studien wurde die Detektion der miRNAs mittels ISH bzw. FISH an Gewebeschnitten von Chorionzotten durchgeführt. Da das Stroma aus einem sehr lockeren Zellverband besteht, die außen liegenden Trophoblastzellen jedoch eng gepackt liegen, sind die Sondensignale in der Trophoblast-Schicht sehr viel deutlicher zu erkennen. In zwei weiteren Untersuchungen (Ishibashi et al., 2012; Kurashina et al., 2014) wurden Stroma- und Trophoblastzellen mittels Laser Capture Microdissection getrennt und anschließend Expressionsanalysen einzelner C19MC-miRNAs mittels qRT-PCR durchgeführt. Aus den Ergebnissen schlussfolgerten die Autoren zwar, dass die miRNAs im Stroma kaum exprimiert werden, die Expression im Stroma war allerdings nur um das ca. 5–10fache (je nach untersuchter miRNA) geringer als im Trophoblasten. Dies entspricht immer noch einer sehr hohen Expression dieser miRNAs im Stroma und stützt damit die Ergebnisse unserer Studie.
Ein erstaunlicher Aspekt der Schwangerschaft ist, dass der Fetus und die Plazenta, obwohl sie für die Mutter semiallogen sind, vom maternalen Immunsystem nicht angegriffen werden. Maternale Immunzellen spielen im Gegenteil sogar eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft und der Entwicklung der Plazenta. In der Dezidua befinden sich diverse maternale Immunzellen, wie deziduale NK-Zellen (70 %), Makrophagen (< 30 %), T-Lymphozyten (< 20 %) und dendritische Zellen (< 2 %). Insgesamt machen die Immunzellen während des ersten Trimesters 30–40 % aller Deziduazellen aus (Kwak-Kim et al., 2014). Die Toleranz des maternalen Immunsystems wird durch verschiedene maternale und fetale Mechanismen bewirkt (PrabhuDas et al., 2015). So besitzen aus Plazenta gewonnene MSCs immunsuppressive Eigenschaften. Sie lösen in Cokultur mit PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) keine allogene Immunreaktion aus und unterdrücken diese auch in Anwesenheit anderer allogener Zellen. Diese Wirkung ist sogar ohne direkten Zellkontakt möglich (Chang et al., 2006; Abumaree et al., 2012). Auch von der Plazenta bzw. dem Trophoblasten sezernierte Exosomen üben einen immunsuppressiven Einfluss aus (Frangsmyr et al., 2005; Sabapatha et al., 2006; Taylor et al., 2006; Hedlund et al., 2009; Mincheva-Nilsson und Baranov, 2010; Stenqvist et al., 2013). Exosomen sind 50–100 nm große Membranvesikel

endosomalen Ursprungs, die durch Verschmelzen der Endosomen mit der Zellmembran freigesetzt werden (Thery et al., 2002). Sie sind in der Lage, ihren Inhalt an andere Zellen weiterzugeben und tragen so zur Zell-Zell-Kommunikation bei (Ramachandran und Palanisamy, 2012). Neben Proteinen und mRNAs enthalten sie auch miRNAs, die in den Empfängerzellen funktionell sind und deren Genexpression beeinflussen (Valadi et al., 2007). Luo et al. (2009) wiesen als Erste nach, dass die von Trophoblastzellen sezernierten Exosomen C19MC-miRNAs enthalten. Spätere Untersuchungen ergaben, dass C19MC-miRNAs sogar den größten Anteil der in Trophoblast-Exosomen enthaltenen miRNAs darstellen (Donker et al., 2012).

Die Tatsache, dass sowohl plazentare MSCs als auch Trophoblasten-Exosomen immunsuppressive Wirkungen aufweisen und beide C19MC-miRNAs exprimieren bzw. enthalten, führte unsererseits zu der Hypothese, dass die C19MC-miRNAs an der Immuntoleranz während der Schwangerschaft beteiligt sind und dass die C19MC-miRNAs somit ihre Funktion nicht (bzw. nicht ausschließlich) in den Zellen ausüben, in denen sie exprimiert werden, sondern dass sie via Exosomen auf andere Zellen übertragen werden (Bullerdiek und Flor, 2012). Der Umstand, dass auch MSCs aus chorioamniotischer Membran immunsuppressiv sind (Bailo et al., 2004; Magatti et al., 2008) und dieses Gewebe ebenfalls C19MC exprimiert (Flor et al., 2012), stützt diese Hypothese zusätzlich. Im Bezug auf Schilddrüsenadenome und TGCTs (und andere Tumoren) wäre es ebenfalls vorstellbar, dass sie diesen Mechanismus nutzen, um sich vor Angriffen durch das Immunsystem zu schützen. Bei Zutreffen dieser Überlegungen böte sich die Möglichkeit, C19MC-miRNAs zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen oder zur Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen oder der Graft-versus-Host-Reaktion einzusetzen. Entsprechend ließen sich C19MC-Antagonisten zur Behandlung von C19MC-überexprimierenden Tumoren verwenden.

Ein direkter Transfer von C19MC miRNAs durch Exosomen auf Immunzellen wurde tatsächlich durch *in vitro* Versuche mit BeWo- und Jurkat-Zellen nachgewiesen. BeWo ist eine Chorionkarzinom-Zelllinie, die C19MC exprimiert und diese miRNAs auch in Exosomen sezerniert. Bei Jurkat handelt es sich um eine immortalisierte T-Lymphozyten-Zelllinie. Es wurde nachgewiesen, dass die BeWo-Exosomen bzw. die darin enthaltenen miRNAs von Jurkat-Zellen aufgenommen werden und dort Veränderungen in der Genexpression bewirken. Für miR-517a-3p wurde gezeigt, dass diese miRNA in den Jurkat-Zellen *PRKG1* herunterreguliert (Kambe et al.,

2014). PRKG1 ist eine Serin/Threonin-Kinase, die am Stickstoffmonoxid/cGMP-Signalweg beteiligt ist, der die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen negativ reguliert (Fischer et al., 2001). Außerdem wurde gezeigt, dass miR-517a-3p und miR-518b in NK-Zellen des peripheren Blutes (nicht aber in regulatorischen T-Zellen (Treg-Zellen)) von Schwangeren im dritten Trimester vorhanden sind und deren Level in den NK-Zellen nach der Entbindung signifikant abfallen (Kambe et al., 2014). Die Expression von *PRKG1* korrelierte in den NK-Zellen negativ mit miR-517a-3p und stieg dort entsprechend nach der Entbindung signifikant an. Bei Nicht-Schwangeren ließen sich miR-517a-3p und miR-518b in NK-Zellen nicht nachweisen. Auch im *in vitro*-Versuch wurde demonstriert, dass NK-Zellen miR-517a-3p aus BeWo-Exosomen aufnehmen. Dies wurde *in vitro* zwar auch bei Treg-Zellen beobachtet (im Gegensatz zu den maternalen Treg-Zellen), allerdings in geringerem Maße als bei NK-Zellen (Kambe et al., 2014). In einer Nachfolgepublikation wurde zudem gezeigt, dass die Menge an miR-517a-3p und miR-518b in NK-Zellen vom ersten zum dritten Trimester zunimmt (Ishida et al., 2015). Der genaue Einfluss von C19MC auf NK-Zellen und wie dies möglicherweise zur Immuntoleranz beiträgt, ist allerdings noch ungeklärt. Delorme-Axford et al. (2013b) konnten einen weiteren Effekt von C19MC-enthaltenden Exosomen nachweisen. Sie zeigten, dass primäre Trophoblastzellen resistent gegenüber einer Infektion mit einer Reihe verschiedener Viren (Coxsackie-Virus B3 (CVB), Poliovirus (PV), Vesicular stomatitis virus (VSV), Vacciniavirus (VV), Herpes-simplex-Virus-1 (HSV-1), humanes Cytomegalievirus (CMV)) sind und dass diese Resistenz durch die Induktion von Autophagie in den Zellen bedingt ist. Sie demonstrierten außerdem, dass diese Resistenz auch durch vom Trophoblasten sezernierte Exosomen auf andere Zellen übertragen wird und dass Zellen, die normalerweise keine C19MC-miRNAs exprimieren, ebenfalls resistent werden, wenn sie mit einem C19MC-exprimierenden BAC-Vektor oder mit *mimics* von miR-517a/b-3p, -516b-5p oder -512-3p transfiziert werden.

Der Trophoblast könnte somit während der Schwangerschaft systemischen Schutz vor viralen Infektionen ermöglichen, indem er mittels C19MC-miRNAs enthaltenden Exosomen die Resistenz gegenüber Viren auch auf fetale, maternale und andere Plazenta-Zellen überträgt (Delorme-Axford et al., 2013a). In dieser Studie wurden auch Exosomen bzw. konditioniertes Medium der Chorionkarzinom-Zelllinien JEG-3 und BeWo untersucht, die den Empfängerzellen jedoch keine Resistenz gegenüber Virusinfektionen verliehen (Delorme-Axford et al., 2013b). Dies ist insofern

erstaunlich, als dass diese Zelllinien ebenfalls C19MC miRNAs exprimieren (Donker et al., 2012) und für BeWo-Zellen demonstriert wurde, dass diese Exosomen sezernieren, welche zumindest miR-517a-3p enthalten (Luo et al., 2009; Kambe et al., 2014).

Eine weitere interessante Eigenschaft der Plazenta, die sie mit malignen Tumoren teilt, ist die Fähigkeit ihrer Zellen zur Invasion und Migration. Der Mensch und andere Primaten besitzen eine hämochoriale Plazenta. Diese zeichnet sich durch eine starke Invasion und den direkten Kontakt von fetalem Gewebe mit dem mütterlichen Blut aus. Dieser Plazentatyp kommt zwar auch bei Nagetieren vor, allerdings dringt der Trophoblast beim Menschen und einigen anderen Primaten bis ins innere Drittel des Myometriums vor, bei der Maus hingegen ist die Invasion auf die Dezidua beschränkt (Schmidt et al., 2015). Innerhalb der Gruppe der Primaten besitzen die Homininae die am stärksten invasive Plazenta (Crosley et al., 2013). Da C19MC primatenspezifisch ist, legt dies die Vermutung nahe, dass C19MC bei der Steuerung der Invasivität eine Rolle spielt.

Um den Einfluss von C19MC auf die Invasivität der Plazenta zu untersuchen, wurde in einer Studie von Xie et al. (2014) C19MC in villösem Trophoblasten (VT) im Vergleich zu extravillösem Trophoblasten (EVT) untersucht. Villöse Zytotrophoblastzellen sind proliferativ aktiv, zeigen aber kein invasives Verhalten. Während der Differenzierung zu EVT jedoch erlangen sie invasive Fähigkeiten, stellen aber die Proliferation ein, sobald sie die Zellsäule verlassen (Huppertz, 2012). Ein Vergleich der Expression von C19MC in VT und EVT zeigte, dass C19MC in dem invasiveren EVT niedriger exprimiert ist als in VT. Eine Überexpression sämtlicher C19MC miRNAs mit Hilfe eines BAC-Vektors hemmte in der EVT-Zelllinie HTR-8/SVneo, welche normalerweise C19MC kaum exprimiert, deren Fähigkeit zur Migration, hatte jedoch keinen Einfluss auf Proliferation oder Apoptose. Untersuchungen zur Identifizierung der Zielgene zeigten, dass miR-519d-3p die Gene *CXCL6*, *FOXL2* und *NR4A2* reguliert, welche an Zellbewegung, -migration und -invasion beteiligt sind (Xie et al., 2014). Möglicherweise ist also die Funktion von C19MC nicht die Förderung der Migrations- und Invasionsfähigkeit, sondern vielmehr die Kontrolle bzw. Hemmung anderer an diesen Prozessen beteiligter Faktoren, um einer zu starken Invasion der Plazenta entgegenzusteuern.

Diese Annahme wird auch durch Untersuchungen an Plazenten von Präeklampsie-Patientinnen gestützt. Bei Präeklampsie handelt es sich um eine schwerwiegende

Erkrankung, die in 5–8 % aller Schwangerschaften auftritt und damit die häufigste Komplikation während der Schwangerschaft und die Hauptursache für Morbidität und Mortalität von Mutter und Kind ist (Smets et al., 2006; Morales-Prieto et al., 2014). Sie ist assoziiert mit einer unzureichenden Invasion und Umwandlung der Spiralarterien durch den EVT. Dies löst wahrscheinlich Entzündungsreaktionen seitens der Mutter aus, was wiederum das Auftreten von Bluthochdruck und Proteinurie bei der Mutter bedingt (Crosley et al., 2013). Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass in Plazenten von Präeklampsie-Patientinnen, diverse C19MC miRNAs höher exprimiert werden als bei gesunden Schwangeren (Hu et al., 2009; Zhu et al., 2009; Ishibashi et al., 2012; Xu et al., 2014). Anton et al. (2015) demonstrierten dies für miR-517a-3p, -517b-3p und -517c-3p und wiesen nach, dass die Überexpression dieser miRNAs in primären EVT-Zellen deren Invasivität reduziert. Ding et al. (2015) zeigten eine höhere Expression von miR-519d-3p in Plazenten von Präeklampsie-Patientinnen und demonstrierten, dass diese miRNA die invasiven und migratorischen Eigenschaften der EVT-Zelllinie HTR-8/SVneo durch die direkte Unterdrückung von MMP2 hemmt. Allerdings wurde in anderen Arbeiten auch eine niedrigere Expression einiger C19MC miRNAs bei Präeklampsie festgestellt (Mayor-Lynn et al., 2011; Betoni et al., 2013; Hromadnikova et al., 2015). Hromadnikova et al. (2015) vermuten, dass dieser Widerspruch zu anderen Publikationen möglicherweise durch eine unterschiedliche Lokalisation der Probenentnahme bedingt ist. Interessant ist allerdings auch, dass in dieser Studie zwar insgesamt niedrigere C19MC-Expressionslevel in Präeklampsie-Plazenten gefunden wurden als in normalen Plazenten, dass diese bei milden Formen von Präeklampsie allerdings noch niedriger waren als bei schweren Verläufen. Dies könnte darauf hindeuten, dass in diesen Fällen die Herunterregulation von C19MC nicht ursächlich für die Präeklampsie ist, sondern vielmehr einen Kompensationsmechanismus darstellt (Hromadnikova et al., 2015) durch den die aufgrund anderer Faktoren gestörte Invasivität gesteigert werden soll.

C19MC könnte auch noch auf andere Weise an der Entstehung von Präeklampsie beteiligt sein. Wie oben beschrieben, wurde für periphere NK-Zellen gezeigt, dass sie während der Schwangerschaft C19MC-miRNAs enthalten, die wahrscheinlich via Trophoblast-Exosomen auf diese übertragen werden (Kambe et al., 2014). Deziduale NK-Zellen sind an der Plazentaentwicklung und Umwandlung der Spiralarterien beteiligt, indem sie angiogene Faktoren sezernieren und EVT-Zellen anlocken (Le

Bouteiller, 2013) und die fehlerhafte Regulation peripherer und dezidualer NK-Zellen steht in Verbindung mit Präeklampsie, wie auch anderen Schwangerschaftskomplikationen wie Implantationsversagen und wiederholten Fehlgeburten (Saito et al., 2008; Fukui et al., 2012). Demnach spielt möglicherweise die aberrante Expression von C19MC und eine dadurch verursachte Fehlsteuerung der NK-Zellen bei der Entstehung einer Präeklampsie eine Rolle. C19MC könnte also sowohl durch die Steuerung der Invasivität der Trophoblastzellen als auch über die Regulation der NK-Zellen via Exosomen für eine erfolgreiche Plazentation von Bedeutung sein.

5 Zusammenfassung

miRNAs beeinflussen die Genexpression, indem sie an mRNAs binden und diese spalten oder die Translation inhibieren. In der chromosomalen Bande 19q13.4 sind zwei miRNA-Cluster lokalisiert: das mit 62 miRNAs größte menschliche miRNA-Cluster C19MC („chromosome 19 miRNA cluster“) und das aus sechs miRNAs bestehende Cluster miR-371-3. C19MC und miR-371-3 werden physiologischerweise in embryonalen Stammzellen und in der Plazenta exprimiert. Die Expression von C19MC wird über eine CpG-Insel in der Promotorregion gesteuert. Es handelt sich um ein Imprinting-Gen, das nur vom paternalen Allel exprimiert wird. C19MC und miR-371-3 sind in verschiedenen Tumorentitäten dereguliert und ihre aberrante Expression wurde sowohl mit onkogenen als auch mit tumorsuppressiven Eigenschaften in Verbindung gebracht.

In einer Untergruppe von follikulären Schilddrüsenadenomen sind beide Cluster aufgrund einer Translokation reaktiviert. In dieser Dissertation wurde gezeigt, dass C19MC und miR-371-3 in Schilddrüsenkarzinomen gleich welcher Histologie nicht aktiviert sind und die Expression von C19MC und miR-371-3 in Schilddrüsenfollikelepithel bzw. Schilddrüsenadenomen somit offenbar keine Prädisposition für eine maligne Transformation darstellt bzw. maligne Eigenschaften fördert. Hingegen wurde bei der Untersuchung von testikulären Keimzelltumoren unterschiedlicher Histologie und unterschiedlicher klinischer Stadien eine signifikant erhöhte C19MC-Expression in Nicht-Seminomen sowie in Tumoren höherer Stadien festgestellt, d. h. höhere Expressionslevel sind in dieser Entität mit erhöhter Malignität assoziiert. Diese Ergebnisse sprechen für unterschiedliche Funktionen von C19MC in Schilddrüsenadenomen und testikulären Keimzelltumoren, was auf die unterschiedlichen Bedingungen in den Zellen, u. a. bezüglich der Expression möglicher Zielgene der miRNAs, zurückzuführen sein dürfte.

Die Messung einer C19MC-miRNA in prä- und postoperativ gewonnenen Serumproben der Hodenkrebs-Patienten zeigte, dass diese C19MC-miRNA ein potentieller Tumormarker für bestimmte Typen von testikulären Keimzelltumoren ist.

Anhand der Untersuchung von mesenchymalen Stroma-/Stammzellen (MSCs), die aus Chorionzottenbiopsien und reifer Plazenta gewonnen wurden, konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von C19MC entgegen der bisherigen Annahme nicht auf den Trophoblasten beschränkt ist, sondern dass plazentare

Stromazellen C19MC ebenfalls hoch exprimieren. Auch in nativer chorioamniotischer Membran wurde eine hohe C19MC-Expression festgestellt. Da plazentare und chorioamniotische MSCs immunsuppressive Eigenschaften besitzen, wäre eine Rolle von C19MC bei der Induktion der Toleranz des maternalen Immunsystems gegenüber der semiallogenen Plazenta und dem Fetus während der Schwangerschaft denkbar. Entsprechend könnten auch manche Tumoren mittels C19MC-miRNAs der Immunabwehr entgehen. Bei einer immunsuppressiven Funktion von C19MC wäre eine therapeutische Nutzung von C19MC-miRNAs zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen oder zur Unterdrückung der Immunreaktion bei der Transplantation allogener Gewebe vorstellbar.

6 Summary

miRNAs regulate gene expression by binding to mRNAs and promoting their cleavage or inhibiting their translation. In chromosomal band 19q13.4 two miRNA clusters are located: the largest human miRNA cluster C19MC ("chromosome 19 miRNA cluster") consisting of 62 miRNAs, and miR-371-3 consisting of five miRNAs. C19MC and miR-371-3 are physiologically expressed in embryonic stem cells and in the placenta. The expression of C19MC is regulated by a CpG island in its promoter region. It is an imprinting gene that is exclusively expressed from the paternal allele. C19MC and miR-371-3 are deregulated in various tumour entities and their aberrant expression is associated with oncogenic as well as tumour suppressive properties.

In a subgroup of thyroid follicular adenomas both clusters are reactivated due to a chromosomal translocation. In this thesis, it was demonstrated that C19MC and miR-371-3 are not activated in thyroid carcinomas regardless of their histology. Thus, the expression of C19MC and miR-371-3 does apparently not predispose thyroid follicular epithelium or follicular adenomas to malignant transformation nor does it promote malignant behaviour. In contrast, the examination of testicular germ cell tumours of different histologic types and clinical stages revealed a significantly higher expression of C19MC in non-seminomas and tumours in advanced clinical stages, i. e. in this tumour entity higher expression levels are associated with higher malignancy. These results suggest different functions of C19MC in thyroid adenomas and testicular germ cell tumours, probably due to different cellular conditions, e. g. regarding expression of potential target genes of the miRNAs.

The measurement of one member of C19MC in pre- and postoperatively obtained serum samples of testicular cancer patients showed that this C19MC miRNA might be a potential tumour marker for certain types of testicular germ cell tumours.

By examining mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) derived from chorionic villus sampling and from term placenta it was demonstrated that, contrary to the previous assumption, C19MC expression is not confined to trophoblast cells but placental stromal cells also highly express C19MC miRNAs. In native chorioamniotic membrane tissue a high expression of C19MC miRNAs was observed as well. Since placental and chorioamniotic mesenchymal stromal cells possess immunosuppressive properties C19MC miRNAs might play a role in inducing tolerance of the maternal immune system against the semiallogeneic placenta and

fetus during pregnancy. Accordingly, some tumours could evade immune defence by means of C19MC miRNAs. In case of an immunosuppressive function of C19MC its miRNAs might be applied to treat autoimmune diseases or to suppress the immune response against allogeneic tissue transplants.

7 Literaturverzeichnis

Abdelmohsen K, Kim MM, et al. (2010). *miR-519 suppresses tumor growth by reducing HuR levels*. Cell Cycle **9**(7): 1354-1359.

Abdelmohsen K, Srikantan S, et al. (2008). *miR-519 reduces cell proliferation by lowering RNA-binding protein HuR levels*. Proc Natl Acad Sci U S A **105**(51): 20297-20302.

Abumaree M, Al Jumah M, et al. (2012). *Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells*. Stem Cell Rev **8**(2): 375-392.

Alexiou P, Maragkakis M, et al. (2009). *Lost in translation: an assessment and perspective for computational microRNA target identification*. Bioinformatics **25**(23): 3049-3055.

Almstrup K, Mlynarska O, et al. *Germ Cell Cancer, Testicular Dysgenesis Syndrome and Epigenetics*. In: Epigenetics and Human Reproduction. S. Rousseaux und S. Khochbin (Hrsg.). Springer Berlin Heidelberg**:** 19-442011.

Anton L, Olarerin-George AO, et al. (2015). *Placental Expression of miR-517a/b and miR-517c Contributes to Trophoblast Dysfunction and Preeclampsia*. PLoS One **10**(3): e0122707.

Arora N, Scognamiglio T, et al. (2008). *Do benign thyroid nodules have malignant potential? An evidence-based review*. World Journal of Surgery **32**(7): 1237-1246.

Augello C, Vaira V, et al. (2012). *MicroRNA profiling of hepatocarcinogenesis identifies C19MC cluster as a novel prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma*. Liver Int **32**(5): 772-782.

Bailo M, Soncini M, et al. (2004). *Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta*. Transplantation **78**(10): 1439-1448.

Bar M, Wyman SK, et al. (2008). *MicroRNA discovery and profiling in human embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries*. Stem Cells **26**(10): 2496-2505.

Bartel DP (2004). *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell **116**(2): 281-297.

Belge G, Dieckmann KP, et al. (2012). *Serum levels of microRNAs miR-371-3: a novel class of serum biomarkers for testicular germ cell tumors?* European Urology **61**(5): 1068-1069.

Belge G, Rippe V, et al. (2001). *Delineation of a 150-kb breakpoint cluster in benign thyroid tumors with 19q13.4 aberrations*. Cytogenetics and Cell Genetics **93**(1-2): 48-51.

Belge G, Roque L, et al. (1998). *Cytogenetic investigations of 340 thyroid hyperplasias and adenomas revealing correlations between cytogenetic findings and histology*. Cancer Genet Cytogenet **101**(1): 42-48.

Bentwich I, Avniel A, et al. (2005). *Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs*. Nat Genet **37**(7): 766-770.

Betoni JS, Derr K, et al. (2013). *MicroRNA analysis in placentas from patients with preeclampsia: comparison of new and published results*. Hypertens Pregnancy **32**(4): 321-339.

Bing Z, Master SR, et al. (2012). *MicroRNA expression profiles of seminoma from paraffin-embedded formalin-fixed tissue*. Virchows Archiv **461**(6): 663-668.

Borchert GM, Lanier W, et al. (2006). *RNA polymerase III transcribes human microRNAs*. Nat Struct Mol Biol **13**(12): 1097-1101.

Borgdorff V, Lleonart ME, et al. (2010). *Multiple microRNAs rescue from Ras-induced senescence by inhibiting p21(Waf1/Cip1)*. Oncogene **29**(15): 2262-2271.

Bortolin-Cavaillé ML, Dance M, et al. (2009). *C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein-coding transcripts*. Nucleic Acids Res **37**(10): 3464-3473.

Boublikova L, Buchler T, et al. (2014). *Molecular biology of testicular germ cell tumors: unique features awaiting clinical application*. Critical Reviews in Oncology/Hematology **89**(3): 366-385.

Brown GT and Murray GI (2015). *Current mechanistic insights into the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis*. Journal of Pathology **237**(3): 273-281.

Bullerdiek J and Flor I (2012). *Exosome-delivered microRNAs of "chromosome 19 microRNA cluster" as immunomodulators in pregnancy and tumorigenesis*. Mol Cytogenet **5**(1): 27.

Cai X, Hagedorn CH, et al. (2004). *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs*. RNA **10**(12): 1957-1966.

Cairo S, Wang Y, et al. (2010). *Stem cell-like micro-RNA signature driven by Myc in aggressive liver cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A **107**(47): 20471-20476.

Cao H, Yang CS, et al. (2008). *Evolutionary emergence of microRNAs in human embryonic stem cells*. PLoS One **3**(7): e2820.

Cedar H and Bergman Y (2012). *Programming of DNA methylation patterns*. Annual Review of Biochemistry **81**: 97-117.

Chang CJ, Yen ML, et al. (2006). *Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-gamma*. Stem Cells **24**(11): 2466-2477.

Cowland JB, Hother C, et al. (2007). *MicroRNAs and cancer*. APMIS **115**(10): 1090-1106.

Crosley EJ, Elliot MG, et al. (2013). *Placental invasion, preeclampsia risk and adaptive molecular evolution at the origin of the great apes: evidence from genome-wide analyses*. Placenta **34**(2): 127-132.

Davis-Dusenbery BN and Hata A (2010). *Mechanisms of control of microRNA biogenesis*. J Biochem **148**(4): 381-392.

De Dellis RA, Lloyd RV, et al. (Hrsg). World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs. IARC Press. Lyon, 2004.

Declaration of Helsinki (2013). Abgerufen am 10.08.2015 von http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/.

Delorme-Axford E, Bayer A, et al. (2013a). *Autophagy as a mechanism of antiviral defense at the maternal-fetal interface*. Autophagy **9**(12): 2173-2174.

Delorme-Axford E, Donker RB, et al. (2013b). *Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **110**(29): 12048-12053.

Denli AM, Tops BB, et al. (2004). *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex*. Nature **432**(7014): 231-235.

Dieckmann KP, Spiekermann M, et al. (2012). *MicroRNAs miR-371-3 in serum as diagnostic tools in the management of testicular germ cell tumours*. British Journal of Cancer **107**(10): 1754-1760.

Ding J, Huang F, et al. (2015). *MiR-519d-3p Suppresses Invasion and Migration of Trophoblast Cells via Targeting MMP-2*. PLoS One **10**(3): e0120321.

Donker RB, Mouillet JF, et al. (2012). *The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes*. Molecular Human Reproduction **18**(8): 417-424.

Fischer TA, Palmetshofer A, et al. (2001). *Activation of cGMP-dependent protein kinase Ibeta inhibits interleukin 2 release and proliferation of T cell receptor-stimulated human peripheral T cells*. Journal of Biological Chemistry **276**(8): 5967-5974.

Flor I and Bullerdiek J (2012). *The dark side of a success story: microRNAs of the C19MC cluster in human tumours*. Journal of Pathology **227**(3): 270-274.

Flor I, Neumann A, et al. (2012). *Abundant expression and hemimethylation of C19MC in cell cultures from placenta-derived stromal cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications **422**(3): 411-416.

Flor I, Spiekermann M, et al. (im Druck). *Expression of microRNAs of C19MC in different histologic types of testicular germ cell tumours*. Cancer Genomics and Proteomics **13**(4).

Fornari F, Milazzo M, et al. (2012). *In hepatocellular carcinoma miR-519d is up-regulated by p53 and DNA hypomethylation and targets CDKN1A/p21, PTEN, AKT3 and TIMP2*. Journal of Pathology **227**(3): 275-285.

Frangsmyr L, Baranov V, et al. (2005). *Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta: switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to vesicular level*. Mol Hum Reprod **11**(1): 35-41.

Friedman RC, Farh KK, et al. (2009). *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. Genome Research **19**(1): 92-105.

Fukui A, Yokota M, et al. (2012). *Changes of NK cells in preeclampsia*. American Journal of Reproductive Immunology **67**(4): 278-286.

Gennarino VA, D'Angelo G, et al. (2012). *Identification of microRNA-regulated gene networks by expression analysis of target genes*. Genome Research **22**(6): 1163-1172.

Gillis AJ, Rijlaarsdam MA, et al. (2013). *Targeted serum miRNA (TSmiR) test for diagnosis and follow-up of (testicular) germ cell cancer patients: A proof of principle*. Mol Oncol **7**(6): 1083-1092.

Gillis AJ, Stoop HJ, et al. (2007). *High-throughput microRNAome analysis in human germ cell tumours*. J Pathol **213**(3): 319-328.

Gregory RI, Yan KP, et al. (2004). *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. Nature **432**(7014): 235-240.

Haider SG. *Männliche Geschlechtsorgane*. In: Anatomie. K. Zilles und B. N. Tillmann (Hrsg.). Springer Medizin Verlag. Heidelberg, 2010.

Han J, Lee Y, et al. (2004). *The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing*. Genes and Development **18**(24): 3016-3027.

Hedlund M, Stenqvist AC, et al. (2009). *Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function*. J Immunol **183**(1): 340-351.

Hinman MN and Lou H (2008). *Diverse molecular functions of Hu proteins*. Cellular and Molecular Life Sciences **65**(20): 3168-3181.

Hromadnikova I, Kotlabova K, et al. (2015). *Expression Profile of C19MC microRNAs in Placental Tissue in Pregnancy-Related Complications*. DNA and Cell Biology **34**(6): 437-457.

Hu Y, Li P, et al. (2009). *Differential expression of microRNAs in the placentae of Chinese patients with severe pre-eclampsia*. Clin Chem Lab Med **47**(8): 923-929.

Huang Q, Gumireddy K, et al. (2008). *The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis*. Nat Cell Biol **10**(2): 202-210.

Huppertz B (2008). *The anatomy of the normal placenta*. J Clin Pathol **61**(12): 1296-1302.

Huppertz B, Berghold VM, et al. (2012). *A variety of opportunities for immune interactions during trophoblast development and invasion*. American Journal of Reproductive Immunology **67**(5): 349-357.

Imamura T, Hikita A, et al. (2012). *The roles of TGF-beta signaling in carcinogenesis and breast cancer metastasis*. Breast Cancer **19**(2): 118-124.

Ishibashi O, Ohkuchi A, et al. (2012). *Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1 is dysregulated by miR-210 and miR-518c that are aberrantly expressed in preeclamptic placentas: a novel marker for predicting preeclampsia*. Hypertension **59**(2): 265-273.

Ishida Y, Zhao D, et al. (2015). *Maternal peripheral blood natural killer cells incorporate placenta-associated microRNAs during pregnancy*. International Journal of Molecular Medicine **35**(6): 1511-1524.

James JL, Carter AM, et al. (2012). *Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part I: What do we know about formative placental development following implantation?* Placenta **33**(5): 327-334.

Ji L, Brkic J, et al. (2013). *Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia*. Molecular Aspects of Medicine **34**(5): 981-1023.

Kambe S, Yoshitake H, et al. (2014). *Human exosomal placenta-associated miR-517a-3p modulates the expression of PRKG1 mRNA in Jurkat cells*. Biology of Reproduction **91**(5): 129.

Kan H, Guo W, et al. (2015). *MicroRNA-520g induces epithelial-mesenchymal transition and promotes metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting SMAD7*. FEBS Letters **589**(1): 102-109.

Kapur RP, Berry JE, et al. (2014). *Activation of the chromosome 19q microRNA cluster in sporadic and androgenetic-biparental mosaicism-associated hepatic mesenchymal hamartoma*. Pediatric and Developmental Pathology **17**(2): 75-84.

Karger S, Krause K, et al. (2006). *Molekulare Pathogenese von Schilddrüsentumoren*. Deutsche Medizinische Wochenschrift **131**(30): 1671-1674.

Kaufmann P. *Plazenta*. In: Anatomie. K. Zilles und B. N. Tillmann (Hrsg.). Springer Medizin Verlag. Heidelberg, 2010.

Ke H, Pei J, et al. (2004). *Putative tumor suppressor Lats2 induces apoptosis through downregulation of Bcl-2 and Bcl-x(L)*. Experimental Cell Research **298**(2): 329-338.

Keklikoglou I, Koerner C, et al. (2011). *MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF-kappaB and TGF-beta signaling pathways*. Oncogene **31**(37): 4150-4163.

Kim VN, Han J, et al. (2009a). *Biogenesis of small RNAs in animals*. Nat Rev Mol Cell Biol **10**(2): 126-139.

Kim YK, Yu J, et al. (2009b). *Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer*. Nucleic Acids Res **37**(5): 1672-1681.

Kleinman CL, Gerges N, et al. (2014). *Fusion of TTYH1 with the C19MC microRNA cluster drives expression of a brain-specific DNMT3B isoform in the embryonal brain tumor ETMR*. Nature Genetics **46**(1): 39-44.

Korshunov A, Sturm D, et al. (2013). *Embryonal tumor with abundant neuropil and true rosettes (ETANTR), ependymoblastoma, and medulloepithelioma share molecular similarity and comprise a single clinicopathological entity*. Acta Neuropathol **128**(2): 279-289.

Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). Berlin, 2013.

Kurashina R, Kikuchi K, et al. (2014). *Placenta-specific miRNA (miR-512-3p) targets PPP3R1 encoding the calcineurin B regulatory subunit in BeWo cells*. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research **40**(3): 650-660.

Kwak-Kim J, Bao S, et al. (2014). *Immunological modes of pregnancy loss: inflammation, immune effectors, and stress*. American Journal of Reproductive Immunology **72**(2): 129-140.

Landgraf P, Rusu M, et al. (2007). *A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing*. Cell **129**(7): 1401-1414.

Landthaler M, Yalcin A, et al. (2004). *The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis*. Current Biology **14**(23): 2162-2167.

Laurent LC, Chen J, et al. (2008). *Comprehensive microRNA profiling reveals a unique human embryonic stem cell signature dominated by a single seed sequence*. Stem Cells **26**(6): 1506-1516.

Le Bouteiller P (2013). *Human decidual NK cells: unique and tightly regulated effector functions in healthy and pathogen-infected pregnancies*. Front Immunol **4**: 404.

Lee KH, Goan YG, et al. (2009). *MicroRNA-373 (miR-373) post-transcriptionally regulates large tumor suppressor, homolog 2 (LATS2) and stimulates proliferation in human esophageal cancer*. Exp Cell Res **315**(15): 2529-2538.

Lee Y, Ahn C, et al. (2003). *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature **425**(6956): 415-419.

Lee Y, Jeon K, et al. (2002). *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. EMBO Journal **21**(17): 4663-4670.

Lee Y, Kim M, et al. (2004). *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO Journal **23**(20): 4051-4060.

Li M, Lee KF, et al. (2009). *Frequent amplification of a chr19q13.41 microRNA polycistron in aggressive primitive neuroectodermal brain tumors*. Cancer Cell **16**(6): 533-546.

Li Y, Pei J, et al. (2003). *Lats2, a putative tumor suppressor, inhibits G1/S transition*. Oncogene **22**(28): 4398-4405.

Liang Y, Ridzon D, et al. (2007). *Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues*. BMC Genomics **8**: 166.

Lin S, Cheung WK, et al. (2010). *Computational identification and characterization of primate-specific microRNAs in human genome*. Comput Biol Chem **34**(4): 232-241.

Liu P and Wilson MJ (2012). *miR-520c and miR-373 upregulate MMP9 expression by targeting mTOR and SIRT1, and activate the Ras/Raf/MEK/Erk signaling pathway and NF-kappaB factor in human fibrosarcoma cells*. J Cell Physiol **227**(2): 867-876.

Liu RY, Diao CF, et al. (2013). *miR-371-5p down-regulates pre mRNA processing factor 4 homolog B (PRPF4B) and facilitates the G1/S transition in human hepatocellular carcinoma cells*. Cancer Letters **335**(2): 351-360.

Livak KJ and Schmittgen TD (2001). *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods **25**(4): 402-408.

Looijenga LH, de Munnik H, et al. (1999). *A molecular model for the development of germ cell cancer*. International Journal of Cancer **83**(6): 809-814.

Lu S, Zhu Q, et al. (2015). *Dual-Functions of miR-373 and miR-520c by Differently Regulating the Activities of MMP2 and MMP9*. Journal of Cellular Physiology **230**(8): 1862-1870.

Luo SS, Ishibashi O, et al. (2009). *Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes*. Biol Reprod **81**(4): 717-729.

Magatti M, De Munari S, et al. (2008). *Human amnion mesenchyme harbors cells with allogeneic T-cell suppression and stimulation capabilities*. Stem Cells **26**(1): 182-192.

Marasa BS, Srikantan S, et al. (2010). *MicroRNA profiling in human diploid fibroblasts uncovers miR-519 role in replicative senescence*. Aging (Albany NY) **2**(6): 333-343.

Mayor-Lynn K, Toloubeydokhti T, et al. (2011). *Expression profile of microRNAs and mRNAs in human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia and preterm labor*. Reprod Sci **18**(1): 46-56.

McIntyre A, Gilbert D, et al. (2008). *Genes, chromosomes and the development of testicular germ cell tumors of adolescents and adults*. Genes, Chromosomes and Cancer **47**(7): 547-557.

Mikuz G (2014). *[Testicular cancer - a matter of geography? Epidemiology and etiopathogenesis of germ cell tumors]*. Pathologe **35**(3): 211-217.

Mikuz G. *Kapitel 38 - Männliche Geschlechtsorgane*. In: Pathologie. W. Böcker, H. Denk, P. U. Heitz und H. Moch (Hrsg.). Urban & Fischer bei Elsevier. München, 2008.

Mincheva-Nilsson L and Baranov V (2010). *The role of placental exosomes in reproduction*. Am J Reprod Immunol **63**(6): 520-533.

miRBase: the microRNA database (Release 21) (2014). Abgerufen am 15.12.2015 von http://www.mirbase.org/.

Miyai K, Yamamoto S, et al. (2013). *Allelotyping analysis suggesting a consecutive progression from intratubular germ cell neoplasia to seminoma and then to embryonal carcinoma of the adult testis*. Human Pathology **44**(10): 2312-2322.

Morales-Prieto DM, Ospina-Prieto S, et al. (2014). *Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: Origin, evolution and future of placenta miRNAs*. Placenta **35 Suppl**: S39-45.

Morin RD, O'Connor MD, et al. (2008). *Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells*. Genome Res **18**(4): 610-621.

Mouillet JF, Chu T, et al. (2011). *Expression patterns of placental microRNAs*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol **91**(8): 737-743.

Murray MJ and Coleman N (2012). *Testicular cancer: A new generation of biomarkers for malignant germ cell tumours*. Nat Rev Urol **9**(6): 298-300.

Murray MJ, Halsall DJ, et al. (2011). *Identification of MicroRNAs From the miR-371~373 and miR-302 Clusters as Potential Serum Biomarkers of Malignant Germ Cell Tumors*. Am J Clin Pathol **135**(1): 119-125.

Murray MJ, Saini HK, et al. (2010). *The two most common histological subtypes of malignant germ cell tumour are distinguished by global microRNA profiles, associated with differential transcription factor expression*. Mol Cancer **9**: 290.

Nikiforov YE. *Chapter 7: Thyroid Tumors: Classification, Staging, and General Considerations*. In: Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of the Thyroid. Y. E. Nikiforov, P. W. Biddinger und L. D. R. Thompson (Hrsg.). Philadelphia, 2012.

Nikiforov YE and Ohori NP. *Chapter 8: Follicular adenomas*. In: Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of the Thyroid. Y. E. Nikiforov, P. W. Biddinger und L. D. R. Thompson (Hrsg.). Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2012.

Noguer-Dance M, Abu-Amero S, et al. (2010). *The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta*. Hum Mol Genet **19**(18): 3566-3582.

Novotny GW, Belling KC, et al. (2012). *MicroRNA expression profiling of carcinoma in situ cells of the testis*. Endocr Relat Cancer **19**(3): 365-379.

Okamoto K (2012). *Epigenetics: a way to understand the origin and biology of testicular germ cell tumors*. International Journal of Urology **19**(6): 504-511.

Oosterhuis JW and Looijenga LH (2005). *Testicular germ-cell tumours in a broader perspective*. Nat Rev Cancer **5**(3): 210-222.

Palmer RD, Murray MJ, et al. (2010). *Malignant germ cell tumors display common microRNA profiles resulting in global changes in expression of messenger RNA targets*. Cancer Res **70**(7): 2911-2923.

Pang F, Zha R, et al. (2014). *MiR-525-3p Enhances the Migration and Invasion of Liver Cancer Cells by Downregulating ZNF395*. PLoS One **9**(3): e90867.

Perren A, Komminoth P, et al. *Kapitel 14 - Schilddrüse*. In: Pathologie. W. Böcker, H. Denk, P. U. Heitz und H. Moch (Hrsg.). Urban & Fischer bei Elsevier. München, 2008.

Persson H, Kvist A, et al. (2011). *Identification of new microRNAs in paired normal and tumor breast tissue suggests a dual role for the ERBB2/Her2 gene*. Cancer Research **71**(1): 78-86.

Peterson SM, Thompson JA, et al. (2014). *Common features of microRNA target prediction tools*. Front Genet **5**: 23.

Pfister S, Remke M, et al. (2009). *Novel genomic amplification targeting the microRNA cluster at 19q13.42 in a pediatric embryonal tumor with abundant neuropil and true rosettes*. Acta Neuropathol **117**(4): 457-464.

PrabhuDas M, Bonney E, et al. (2015). *Immune mechanisms at the maternal-fetal interface: perspectives and challenges*. Nat Immunol **16**(4): 328-334.

Qi J, Yu JY, et al. (2009). *microRNAs regulate human embryonic stem cell division*. Cell Cycle **8**(22): 3729-3741.

Rajpert-De Meyts E (2006). *Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects*. Human Reproduction Update **12**(3): 303-323.

Ramachandran S and Palanisamy V (2012). *Horizontal transfer of RNAs: exosomes as mediators of intercellular communication*. Wiley Interdiscip Rev RNA **3**(2): 286-293.

Ren J, Jin P, et al. (2009). *MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cells*. J Transl Med **7**: 20.

Rijlaarsdam MA, van Agthoven T, et al. (2015). *Identification of known and novel germ cell cancer-specific (embryonic) miRs in serum by high-throughput profiling*. Andrology **3**(1): 85-91.

Rippe V, Dittberner L, et al. (2010). *The two stem cell microRNA gene clusters C19MC and miR-371-3 are activated by specific chromosomal rearrangements in a subgroup of thyroid adenomas*. PLoS One **5**(3): e9485.

Rippe V, Flor I, et al. (2012). *Activation of the two microRNA clusters C19MC and miR-371-3 does not play prominent role in thyroid cancer*. Mol Cytogenet **5**: 40.

Roelen DL, van der Mast BJ, et al. (2009). *Differential immunomodulatory effects of fetal versus maternal multipotent stromal cells*. Hum Immunol **70**(1): 16-23.

Sabapatha A, Gercel-Taylor C, et al. (2006). *Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences*. Am J Reprod Immunol **56**(5-6): 345-355.

Saito S, Nakashima A, et al. (2008). *The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy*. Journal of Reproductive Immunology **77**(1): 14-22.

Sasaki H and Matsui Y (2008). *Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond*. Nat Rev Genet **9**(2): 129-140.

Schanen BC and Li X (2010). *Transcriptional regulation of mammalian miRNA genes*. Genomics **97**(1): 1-6.

Schmid KW (1997). *Knoten in der Schilddrüse - Differentialdiagnostische Leitlinien*. Der Pathologe **18**(4): 301-312.

Schmid KW (2010). *Molekularpathologie von Schilddrüsentumoren*. Pathologe **31 Suppl 2**: 229-233.

Schmid KW, Sheu SY, et al. (2003). *Tumoren der Schilddrüse*. Pathologe **24**(5): 357-372.

Schmidt A, Morales-Prieto DM, et al. (2015). *Only humans have human placentas: molecular differences between mice and humans*. Journal of Reproductive Immunology **108**: 65-71.

Selbach M, Schwanhausser B, et al. (2008). *Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs*. Nature **455**(7209): 58-63.

Smets EM, Visser A, et al. (2006). *Novel biomarkers in preeclampsia*. Clinica Chimica Acta **364**(1-2): 22-32.

Songster GS, Sun L, et al. (1992). *Chromosome analysis in spontaneous pregnancy loss: use of placental villus mesodermal core cell cultures*. Am J Med Genet **42**(6): 785-788.

Spiekermann M, Belge G, et al. (2015). *MicroRNA miR-371a-3p in serum of patients with germ cell tumours: evaluations for establishing a serum biomarker*. Andrology **3**(1): 78-84.

Stenqvist AC, Nagaeva O, et al. (2013). *Exosomes secreted by human placenta carry functional Fas ligand and TRAIL molecules and convey apoptosis in activated immune cells, suggesting exosome-mediated immune privilege of the fetus*. Journal of Immunology **191**(11): 5515-5523.

Su JL, Chen PB, et al. (2010). *Downregulation of microRNA miR-520h by E1A contributes to anticancer activity*. Cancer Research **70**(12): 5096-5108.

Syring I, Bartels J, et al. (2015). *Circulating serum miRNA (miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p and miR-373-3p) as biomarkers in patients with testicular germ cell cancer*. Journal of Urology **193**(1): 331-337.

Tay Y, Tan SM, et al. (2014). *Characterization of dual PTEN and p53-targeting microRNAs identifies microRNA-638/Dnm2 as a two-hit oncogenic locus*. Cell Rep **8**(3): 714-722.

Taylor DD, Akyol S, et al. (2006). *Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling*. J Immunol **176**(3): 1534-1542.

Thery C, Zitvogel L, et al. (2002). *Exosomes: composition, biogenesis and function*. Nat Rev Immunol **2**(8): 569-579.

Toffanin S, Hoshida Y, et al. (2011). *MicroRNA-based classification of hepatocellular carcinoma and oncogenic role of miR-517a*. Gastroenterology **140**(5): 1618-1628 e1616.

Tsai KW, Kao HW, et al. (2009). *Epigenetic control of the expression of a primate-specific microRNA cluster in human cancer cells*. Epigenetics **4**(8): 587-592.

Ulfig N (2005). Kurzlehrbuch Embryologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

Vaira V, Elli F, et al. (2012). *The microRNA cluster C19MC is deregulated in parathyroid tumours*. Journal of Molecular Endocrinology **49**(2): 115-124.

Valadi H, Ekstrom K, et al. (2007). *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nat Cell Biol **9**(6): 654-659.

Voorhoeve PM, le Sage C, et al. (2006). *A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors*. Cell **124**(6): 1169-1181.

Welsch U. *Endokrine Organe*. In: Anatomie. K. Zilles und B. N. Tillmann (Hrsg.). Springer Medizin Verlag. Heidelberg, 2010.

Wilting J. *Frühentwicklung*. In: Anatomie. K. Zilles und B. N. Tillmann (Hrsg.). Springer Medizin Verlag. Heidelberg, 2010.

Wittekind C (2008). *[Biology and pathology of testicular germ cell tumours]*. Onkologe **14**(6): 602-610.

Woodward PJ, Heidenreich A, et al. *Germ cell tumours*. In: World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of the Urinary System and Male Genital Organs. J. N. Eble, G. Sauter, J. I. Epstein und I. A. Sesterhann (Hrsg.). IARC Press. Lyon, 2004.

Wu N, Liu X, et al. (2011). *MicroRNA-373, a new regulator of protein phosphatase 6, functions as an oncogene in hepatocellular carcinoma*. FEBS J **278**: 2044–2054.

Wu S, Huang S, et al. (2010). *Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region*. Oncogene **29**(15): 2302-2308.

Xie L, Mouillet JF, et al. (2014). *C19MC microRNAs Regulate the Migration of Human Trophoblasts*. Endocrinology **155**(12): 4975-4985.

Xu P, Zhao Y, et al. (2014). *Variations of MicroRNAs in Human Placentas and Plasma From Preeclamptic Pregnancy*. Hypertension **63**(6): 1276-1284.

Yamashita S, Yamamoto H, et al. (2012). *MicroRNA-372 Is Associated with Poor Prognosis in Colorectal Cancer*. Oncology **82**(4): 205-212.

Yan GR, Xu SH, et al. (2011). *Global identification of miR-373-regulated genes in breast cancer by quantitative proteomics*. Proteomics **11**(5): 912-920.

Yang K, Handorean AM, et al. (2009). *MicroRNAs 373 and 520c are downregulated in prostate cancer, suppress CD44 translation and enhance invasion of prostate cancer cells in vitro*. Int J Clin Exp Pathol **2**(4): 361-369.

Yang X, Wang C, et al. (2015). *miR-526a regulates apoptotic cell growth in human carcinoma cells*. Molecular and Cellular Biochemistry **407**(1-2): 69-76.

Yi R, Qin Y, et al. (2003). *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. Genes and Development **17**(24): 3011-3016.

Yong PJ, McFadden DE, et al. (2011). *Developmental origin of chorionic villus cultures from spontaneous abortion and chorionic villus sampling*. J Obstet Gynaecol Can **33**(5): 449-452.

Yu J, Tan Q, et al. (2015). *The microRNA-520a-3p inhibits proliferation, apoptosis and metastasis by targeting MAP3K2 in non-small cell lung cancer*. Am J Cancer Res **5**(2): 802-811.

Yu SL, Chen HY, et al. (2008). *MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer*. Cancer Cell **13**(1): 48-57.

Zhang R, Wang YQ, et al. (2008). *Molecular evolution of a primate-specific microRNA family*. Mol Biol Evol **25**(7): 1493-1502.

Zhang S, Zhang H, et al. (2015). *MiR-522 contributes to cell proliferation of human glioblastoma cells by suppressing PHLPP1 expression*. Biomedicine and Pharmacotherapy **70**: 164-169.

Zhang X, Li X, et al. (2013). *MicroRNA-373 is upregulated and targets TNFAIP1 in human gastric cancer, contributing to tumorigenesis*. Oncol Lett **6**(5): 1427-1434.

Zhou AD, Diao LT, et al. (2012a). *beta-Catenin/LEF1 transactivates the microRNA-371-373 cluster that modulates the Wnt/beta-catenin-signaling pathway*. Oncogene **31**(24): 2968-2978.

Zhou C, Li X, et al. (2012b). *microRNA-372 maintains oncogene characteristics by targeting TNFAIP1 and affects NFkappaB signaling in human gastric carcinoma cells*. International Journal of Oncology **42**(2): 635-642.

Zhu XM, Han T, et al. (2009). *Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies*. Am J Obstet Gynecol **200**(6): 661 e661-667.

Zubair A and Frieri M (2013). *Role of nuclear factor-kB in breast and colorectal cancer*. Curr Allergy Asthma Rep **13**(1): 44-49.

8 Anhang

Tabelle 1: Übersicht über die miRNAs der Cluster C19MC und miR-371-3 laut aktueller miRBase-Version 21 (*miRBase: the microRNA database*, 2014). Aufgelistet sind jeweils die miRBase-IDs und -Accession-Nummern der Stem-loop-Sequenzen (*precursor* miRNAs) und der aus diesen entstehenden reifen (*mature*) miRNAs. In Klammern sind frühere Namen der miRNAs (aus vorherigen miRBase-Versionen) angegeben. hsa = homo sapiens.

stem loop sequence Accession	stem loop sequence ID	mature sequence Accession	mature sequence ID	mature sequence Accession	mature sequence ID
C19MC					
MI0003142	hsa-mir-498	MIMAT0002824	hsa-miR-498		
MI0003140	hsa-mir-512-1	MIMAT0002823	hsa-miR-512-3p	MIMAT0002822	hsa-miR-512-5p
MI0003141	hsa-mir-512-2	‖	‖	‖	‖
MI0003144	hsa-mir-515-1	MIMAT0002827	hsa-miR-515-3p	MIMAT0002826	hsa-miR-515-5p
MI0003147	hsa-mir-515-2	‖	‖	‖	‖
MI0003180	hsa-mir-516a-1	MIMAT0006778	hsa-miR-516a-3p	MIMAT0004770	hsa-miR-516a-5p
MI0003181	hsa-mir-516a-2	‖	‖	‖	‖
MI0003172	hsa-mir-516b-1	MIMAT0002860	hsa-miR-516b-3p (hsa-miR-516b*)	MIMAT0002859	hsa-miR-516b-5p (hsa-miR-516b)
MI0003167	hsa-mir-516b-2	‖	‖	‖	‖
MI0003161	hsa-mir-517a	MIMAT0002852	hsa-miR-517a-3p (hsa-miR-517a)	MIMAT0002851	hsa-miR-517-5p (hsa-miR-517*)
MI0003165	hsa-mir-517b	MIMAT0002857	hsa-miR-517b-3p (hsa-miR-517b)	‖	‖
MI0003174	hsa-mir-517c	MIMAT0002866	hsa-miR-517c-3p (hsa-miR-517c)	‖	‖
MI0003170	hsa-mir-518a-1	MIMAT0002863	hsa-miR-518a-3p (hsa-miR-518a)	MIMAT0005457	hsa-miR-518a-5p
MI0003173	hsa-mir-518a-2	‖	‖	‖	‖
MI0003156	hsa-mir-518b	MIMAT0002844	hsa-miR-518b		
MI0003159	hsa-mir-518c	MIMAT0002848	hsa-miR-518c-3p (hsa-miR-518c)	MIMAT0002847	hsa-miR-518c-5p (hsa-miR-518c*)
MI0003171	hsa-mir-518d	MIMAT0002864	hsa-miR-518d-3p (hsa-miR-518d)	MIMAT0005456	hsa-miR-518d-5p
MI0003169	hsa-mir-518e	MIMAT0002861	hsa-miR-518e-3p (hsa-miR-518e)	MIMAT0005450	hsa-miR-518e-5p (hsa-miR-518e*)
MI0003154	hsa-mir-518f	MIMAT0002842	hsa-miR-518f-3p (hsa-miR-518f)	MIMAT0002841	hsa-miR-518f-5p (hsa-miR-518f*)
MI0003178	hsa-mir-519a-1	MIMAT0002869	hsa-miR-519a-3p (hsa-miR-519a)	MIMAT0005452	hsa-miR-519a-5p (hsa-miR-519a*)
MI0003182	hsa-mir-519a-2	‖	‖		
MI0003151	hsa-mir-519b	MIMAT0002837	hsa-miR-519b-3p (hsa-miR-519b)	MIMAT0005454	hsa-miR-519b-5p
MI0003148	hsa-mir-519c	MIMAT0002832	hsa-miR-519c-3p (hsa-miR-519c, hsa-miR-526c)	MIMAT0002831	hsa-miR-519c-5p
MI0003162	hsa-mir-519d	MIMAT0002853	hsa-miR-519d-3p (hsa-miR-519d)	MIMAT0026610	hsa-miR-519d-5p
MI0003145	hsa-miR-519e	MIMAT0002829	hsa-miR-519e-3p (hsa-miR-519e)	MIMAT0002828	hsa-miR-519e-5p (hsa-miR-519e*)
MI0003149	hsa-mir-520a	MIMAT0002834	hsa-miR-520a-3p (hsa-miR-520a)	MIMAT0002833	hsa-miR-520a-5p (hsa-miR-520a*)
MI0003155	hsa-mir-520b	MIMAT0002843	hsa-miR-520b		
MI0003158	hsa-mir-520c	MIMAT0002846	hsa-miR-520c-3p (hsa-miR-520c)	MIMAT0005455	hsa-miR-520c-5p
MI0003164	hsa-mir-520d	MIMAT0002856	hsa-miR-520d-3p (hsa-miR-520d)	MIMAT0002855	hsa-miR-520d-5p (hsa-miR-520d*)

stem loop sequence Accession	stem loop sequence ID	mature sequence Accession	mature sequence ID	mature sequence Accession	mature sequence ID
MI0003143	hsa-mir-520e	MIMAT0002825	hsa-miR-520e		
MI0003146	hsa-mir-520f	MIMAT0002830	hsa-miR-520f-3p (hsa-miR-520f)	MIMAT0026609	hsa-miR-520f-5p
MI0003166	hsa-mir-520g	MIMAT0002858	hsa-miR-520g-3p (hsa-miR-520g)	MIMAT0026611	hsa-miR-520g-5p
MI0003175	hsa-mir-520h	MIMAT0002867	hsa-miR-520h		
MI0003176	hsa-mir-521-1	MIMAT0002854	hsa-miR-521		
MI0003163	hsa-mir-521-2	‖	‖		
MI0003177	hsa-mir-522	MIMAT0002868	hsa-miR-522-3p (hsa-miR-522)	MIMAT0005451	hsa-miR-522-5p (hsa-miR-522*)
MI0003153	hsa-mir-523	MIMAT0002840	hsa-miR-523-3p (hsa-miR-523)	MIMAT0005449	hsa-miR-523-5p (hsa-miR-523*)
MI0003160	hsa-mir-524	MIMAT0002850	hsa-miR-524-3p (hsa-miR-524)	MIMAT0002849	hsa-miR-524-5p (hsa-miR-524*)
MI0003152	hsa-mir-525	MIMAT0002839	hsa-miR-525-3p (hsa-miR-525*)	MIMAT0002838	hsa-miR-525-5p (hsa-miR-525)
MI0003157	hsa-mir-526a-1	MIMAT0002845	hsa-miR-526a		
MI0003168	hsa-mir-526a-2	‖	‖		
MI0003150	hsa-mir-526b	MIMAT0002836	hsa-miR-526b-3p (hsa-miR-526b*)	MIMAT0002835	hsa-miR-526b-5p (hsa-miR-526b)
MI0003179	hsa-mir-527	MIMAT0002862	hsa-miR-527		
MI0003832	hsa-mir-1283-1	MIMAT0005799	hsa-miR-1283		
MI0006430	hsa-mir-1283-2	‖	‖		
MI0003786	hsa-mir-1323	MIMAT0005795	hsa-miR-1323		
miR-371-3					
MI0000779	hsa-mir-371a	MIMAT0000723	hsa-miR-371a-3p (hsa-miR-371-3p, hsa-miR-371)	MIMAT0004687	hsa-miR-371a-5p (hsa-miR-371-5p)
MI0017393	hsa-mir-371b	MIMAT0019893	hsa-miR-371b-3p	MIMAT0019892	hsa-miR-371b-5p
MI0000780	hsa-mir-372	MIMAT0000724	hsa-mir-372-3p (hsa-mir-372)	MIMAT0026484	hsa-mir-372-5p
MI0000781	hsa-mir-373	MIMAT0000726	hsa-miR-373-3p (hsa-miR-373)	MIMAT0000725	hsa-miR-373-5p (hsa-miR-373*)

9 Publikationsübersicht

In der folgenden Übersicht sind die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Publikationen in der Reihenfolge, in der sie im Ergebnisteil erscheinen, aufgeführt:

I Rippe V, Flor I, Debler JW, Drieschner N, Rommel B, Krause D, Junker K, Bullerdiek J (2012). "Activation of the two microRNA clusters C19MC and miR-371-3 does not play prominent role in thyroid cancer." Mol Cytogenet **5**: 40.

Eigenanteil: Durchführung der RNA-Isolierung und cDNA-Synthese sowie der qRT-PCR und deren Auswertung zusammen mit J. W. Debler, Planung der Studie zusammen mit J. W. Debler, V. Rippe und J. Bullerdiek, Verfassen des Manuskripts zusammen mit J. Bullerdiek

II Flor I, Spiekermann M, Löning T, Dieckmann K-P, Belge G, Bullerdiek J (im Druck). "Expression of microRNAs of C19MC in different histologic types of testicular germ cell tumours." Cancer Genomics and Proteomics **13** (4).

Eigenanteil: Durchführung der RNA-Isolierung zusammen mit M. Spiekermann, cDNA-Synthese und Präamplifizierung sowie der qRT-PCR und deren Auswertung, statistische Auswertung, Planung der Studie und Verfassen des Manuskripts zusammen mit J. Bullerdiek

III Flor I und Bullerdiek J (2012). "The dark side of a success story: microRNAs of the C19MC cluster in human tumours." Journal of Pathology **227**(3): 270-274.

Eigenanteil: Verfassen des Manuskripts zusammen mit J. Bullerdiek

IV Flor I, Neumann A, Freter C, Helmke BM, Langenbuch M, Rippe V, Bullerdiek J (2012). "Abundant expression and hemimethylation of C19MC in cell cultures from placenta-derived stromal cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **422**(3): 411-416.

Eigenanteil: Durchführung der 5-Aza-dC-Behandlung, RNA-Isolierung und cDNA-Synthese sowie der qRT-PCR und deren Auswertung, Durchführung und Auswertung der DNA-Methylierungsanalyse zusammen mit C. Freter, Planung der Studie und Verfassen des Manuskripts zusammen mit J. Bullerdiek

V Bullerdiek J und Flor I (2012). "Exosome-delivered microRNAs of "chromosome 19 microRNA cluster" as immunomodulators in pregnancy and tumorigenesis." Mol Cytogenet **5**(1): 27.

Eigenanteil: Entwicklung der Hypothese und Verfassen des Manuskripts zusammen mit J. Bullerdiek

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jörn Bullerdiek für die Möglichkeit meine Promotion am Zentrum für Humangenetik durchzuführen und für die wissenschaftliche Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Andreas Dotzauer bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferats. Frau Prof. Dr. Ursula Dicke, Herrn Dr. Volkhard Rippe, Frau Andrea Gottlieb und Frau Svenja Mende danke ich für ihre Teilnahme am Prüfungsausschuss.

Für die Bereitstellung von Probenmaterial danke ich Prof. Dr. Klaus Junker (Klinikum Bremen-Mitte), Prof. Dr. Thomas Löning (Albertinen-Krankenhaus Hamburg), Prof. Dr. Klaus-Peter Dieckmann (Albertinen-Krankenhaus Hamburg), Prof. Dr. Burkhard Helmke (Elbe Klinikum Stade), Prof. Dr. Wolfgang Sendt (St. Joseph-Stift Bremen), Prof. Dr. Ulrich Deichert und Marc Langenbuch (Frauenklinik des Krankenhauses Cuxhaven) sowie Dr. Armin Neumann (Praxis für Pränatalmedizin am Klinikum Links der Weser).

Allen Kollegen des Zentrums für Humangenetik möchte ich für ihre Hilfe und Unterstützung bei meiner Arbeit und ihre Beiträge zu den Publikationen danken, insbesondere PD Dr. Gazanfer Belge, Dr. Volkhard Rippe, Dr. Rolf Nimzyk, Dr. Norbert Drieschner, Meike Spiekermann, Dr. Jörg Müsebeck, Johannes Debler und Catharina Freter sowie Andrea Gottlieb und Dr. Markus Klemke. Besonderer Dank gilt Dr. Dominique Markowski, Dr. Helge Thies, Frauke Meyer, Catharina Freter, Dr. Nina Winter und Kerstin Lucht-Hübner sowohl für ihre fachliche Unterstützung als auch für viele zusammen im und außerhalb des ZHG verbrachte schöne Stunden. Besonders Dominique Markowski möchte ich für die langjährige Freundschaft danken.

Meinen Eltern Renate und Günter Flor und meiner Schwester Wiebke danke ich dafür, dass sie immer für mich da sind, wenn ich sie brauche! Und Thoralf: Danke, dass es dich gibt! Endlich geschafft!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Doktorarbeit mit dem Titel „**Untersuchungen zur Expression der microRNA-Gen-Cluster C19MC und miR-371-3 in Normalgeweben und Tumoren**“ selbstständig verfasst und geschrieben habe und außer den angegebenen Quellen keine weiteren Hilfsmittel verwendet habe.

Ebenfalls erkläre ich hiermit, dass es sich bei den von mir abgegebenen Arbeiten um drei identische Exemplare handelt.

Bremen, den 22. Februar 2016

Inga Flor