

Untersuchungen zur miRNA-Expression in akuten Leukämien



Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Universität Rostock

vorgelegt von
Meike Dahlhaus,
geboren am 01.06.1981 in Münster,
aus Rostock

Gutachter:

1. Gutachter:
Prof. Dr. Christian Junghanß
Klinik für Innere Medizin III, Universität Rostock
2. Gutachter:
Prof. Dr. Birgit Piechulla
Institut für Biowissenschaften, Universität Rostock
3. Gutachter:
Prof. Dr. Jörn Bullerdiek
Zentrum für Humangenetik, Universität Bremen

Datum der Einreichung: 01.04.2010

Datum der Verteidigung: 28.02.2011

*Die großen Geheimnisse sind keine Rätsel,
für die es eine bestimmte Lösung gibt.
Um in sie einzudringen,
muss man sich von ihnen wandeln lassen.*

- Michael Ende -

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
<i>1.1 MicroRNAs</i>	<i>1</i>
1.1.1 Biogenese der miRNAs	1
1.1.2 Wirkungsmechanismen der miRNAs.....	3
1.1.3 Die microRNA 142.....	5
1.1.4 Die microRNA 181a.....	6
<i>1.2 Akute Leukämien.....</i>	<i>9</i>
1.2.1 Die akute myeloische Leukämie.....	9
1.2.2 Die akute lymphatische Leukämie.....	11
1.2.3 Die Translokation 11q23.....	12
<i>Zielstellung.....</i>	<i>14</i>
2. Methoden.....	15
<i>2.1 Zellbiologische Methoden.....</i>	<i>15</i>
2.1.1 Kultivierung humaner Zellen.....	15
2.1.2 Isolierung von MCs aus humanem Knochenmark und peripherem Blut	15
2.1.3 Anreicherung spezifischer Zellpopulationen.....	16
2.1.4 Bestimmung der Zellzahl und - vitalität.....	17
2.1.5 Transfektion von Zelllinien mittels Elektroporation.....	17
2.1.6 Bestimmung der Zellviabilität mittels WST-1.....	18
<i>2.2 Molekularbiologische Methoden.....</i>	<i>18</i>
2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA und Konzentrationsbestimmung.....	18
2.2.2 Reverse Transkription der microRNAs.....	19
2.2.3 DNase-Verdau und Reverse-Transkription für mRNAs.....	19
2.2.4 Quantitative Real-Time-PCR.....	20
2.2.5 MiRNA-Microarrays.....	22
<i>2.3 Durchflusszytometrie.....</i>	<i>24</i>
2.3.1 Bestimmung von Oberflächenantigenen.....	24
2.3.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz	25
2.3.3 Apoptose - und Nekrosenachweis.....	25
<i>2.4 Proteinbiochemische Methoden.....</i>	<i>26</i>
2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford	26
2.4.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	27
2.4.3 Western Blot.....	27
<i>2.5 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....</i>	<i>29</i>
<i>2.6 Statistik.....</i>	<i>29</i>
3. Ergebnisse	30
<i>3.1 Anreicherung hämatopoetischer Zellen</i>	<i>30</i>

3.2 Bestimmung der miRNA-Expression mittels Microarrays.....	31
3.3 Etablierung einer quantitativen PCR zur Bestimmung von miRNAs.....	34
3.4 Expression der miR-142 und miR-181a in Zelllinien und hämatopoetischen Subpopulationen.....	36
3.4.1 Bestimmung der miR-142-Expression mittels qPCR.....	36
3.4.2 Bestimmung der miR-181a-Expression mittels qPCR.....	37
3.5 Bestimmung der miRNA-Expression in de novo Zellen	39
3.5.1 Prognostische Bedeutung der microRNA-Expression.....	43
3.5.2 Zusammenhang der miRNA-Expression mit weiteren diagnostischen Faktoren.....	45
3.6 Hemmung der miR-181a in Zellen der akuten Leukämie.....	47
3.6.1 Etablierung einer miRNA-Inhibition in ALL-Zellen.	47
3.6.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz	48
3.6.3 Expression der miR-181a im Verlauf der Inhibition.....	49
3.6.4 Einfluss der miR-181a Inhibition auf die Proliferation.....	51
3.6.5 Einfluss der miR-181a Inhibition auf die metabolische Aktivität.....	53
3.6.6 Einfluss der miR-181a Inhibition auf Apoptose und Nekrose.....	55
3.6.7 Einfluss der miR-181a Inhibition auf die Expression von Oberflächenantigenen.....	56
3.6.8 Einfluss der miR-181a Inhibition auf die Expression von HMGB1.....	59
3.6.9 Einfluss der miR-181a Inhibition auf die Phosphorylierung der Akt-Kinase.....	61
3.6.10 Einfluss der miR-181a Inhibition auf die Expression von PTEN.....	62
3.7 Überexpression der miR-181a in Zellen der akuten Leukämie.....	63
3.7.1 Bestimmung der Transfektionseffizienz in HL60.....	63
3.7.2 Expression der miR-181a im Verlauf der Überexpression.....	64
3.7.3 Einfluss der miR-181a Überexpression auf die Zellproliferation.....	65
3.7.4 Einfluss der miR-181a Überexpression auf die metabolische Aktivität.....	66
3.7.9 Einfluss der miR-181a Überexpression auf Apoptose und Nekrose.....	67
3.7.5 Einfluss der miR-181a Überexpression auf die Expression von CD4.....	68
3.7.6 Einfluss der miR-181a Überexpression auf die Expression von HMGB1.....	69
3.7.7 Einfluss der miR-181a Überexpression auf die Phosphorylierung von Akt.....	69
3.7.8 Einfluss der miR-181a Überexpression auf die Expression von PTEN.....	70
4. Diskussion.....	71
4.1 Identifizierung differentiell exprimierter miRNAs in akuten Leukämien mittels Microarrays.....	71
4.2 Expression der miR-142 und miR-181a in hämatopoetischen Zellen.....	86
4.3 Prognostische Bedeutung der miRNA-Expression.....	94
4.4 Funktionelle Bedeutung der miR-181a.....	97
4.4.1 Methodische Aspekte.....	97
4.4.2 Bedeutung der miR-181a für die Proliferation und Zellfunktionen.....	98
4.4.3 Bedeutung der Regulation von CD4 durch die miR-181a.....	99
4.4.4 Regulation des HMGB1 durch die miR-181a.....	100
4.4.5 Regulation des PI3K/Akt-Signalweges durch miRNAs.....	101

4.4.6 Möglicher Einfluss der miR-181a auf die Hämatopoese.....	102
<i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	103
5. Literatur	105
6. Abbildungsverzeichnis	121
7. Tabellenverzeichnis	122
8. Abkürzungsverzeichnis	123
9. Anhang	126
9.1 Diskussion der miRs 451, 365,103,193a-3p und 98.....	126
9.2 Angaben zu den verwendeten Zelllinien.....	129
9.3 Patientencharakteristika.....	130
9.4 MiR-181a Expression nach Hemmung mittels ASO.....	132
9.5 MiR-181a Expression nach Überexpression mittels Mimic.....	135
9.6 Zellproliferation nach miR-181a Inhibition	138
9.7 Zellproliferation nach miR-181a Überexpression	141
9.8 Metabolische Aktivität nach miR-181a Inhibition.....	142
9.9 Metabolische Aktivität nach miR-181a Überexpression.....	144
9.10 Apoptoserate nach miR-181a Inhibition.....	145
9.11 Apoptoserate nach miR-181a Überexpression.....	147
9.12 Nekroserate nach miR-181a Inhibition.....	147
9.13 Nekroserate nach miR-181a Überexpression.....	149
9.14 CD4-Expression nach miR-181a Inhibition in MOLT-4.....	150
9.15 CD4-Expression nach miR-181a Überexpression in MOLT-4.....	152
9.16 HMGB1-Expression nach miR-181a Inhibition mit unmodifizierten ASO.....	153
9.16 Material.....	154
<i>Lebenslauf</i>	159
<i>Publikationsverzeichnis</i>	161
<i>Selbstständigkeitserklärung</i>	163
<i>Danksagung</i>	164

1. Einleitung

1.1 MicroRNAs

Die Kontrolle der Genexpression auf RNA-Ebene spielt eine entscheidende Rolle im Metabolismus von Zellen und ihrer Fähigkeit, sich schnell auf veränderte Bedingungen einzustellen. Neben den bisher bekannten Mechanismen wie alternatives Spleißen der messenger RNA (mRNA), Kontrolle der mRNA-Stabilität und der Translation rückte der Weg der RNA-Interferenz (RNAi) in den letzten zehn Jahren immer mehr in den Mittelpunkt der Forschung. Dies ist ein Prozess, bei dem über komplementäre Basenpaarung kleine RNA-Moleküle die Proteinexpression beeinflussen.

Als microRNAs (miRNAs, miRs) werden kurze (17 – 24 Nukleotide), einzelsträngige und endogene RNA-Moleküle bezeichnet. Zusammen mit verschiedenen Proteinen bilden sie den RNA-induced-silencing-complex (RISC) und greifen so in die Genexpression ein. Bis heute sind ~ 750 humane miRNAs entdeckt worden, computergestützte Berechnungen gehen von einer Anzahl um 1000 miRNAs im menschlichen Genom aus [1]. Etwa 60 % der miRNA Gene liegen unabhängig von anderen Strukturen im humanem Genom vor, 15 % liegen in Clustern und können sowohl gemeinsam als auch unabhängig voneinander abgelesen werden. Ca. 25 % der miRNA Gene liegen in Introns von mRNAs, so dass hier eine gleichzeitige Transkription von mRNA und miRNA möglich ist. MiRNAs wurden in allen humanen Geweben nachgewiesen und greifen in eine Vielzahl von Differenzierungs-, Anpassungs- und Stoffwechselprozessen ein. Dysregulierungen in der miRNA-Expression konnten in vielen Krankheiten nachgewiesen werden, wie z.B. Diabetes, Lungenkrebs, Brustkrebs und in verschiedenen Formen der Leukämie.

1.1.1 Biogenese der miRNAs

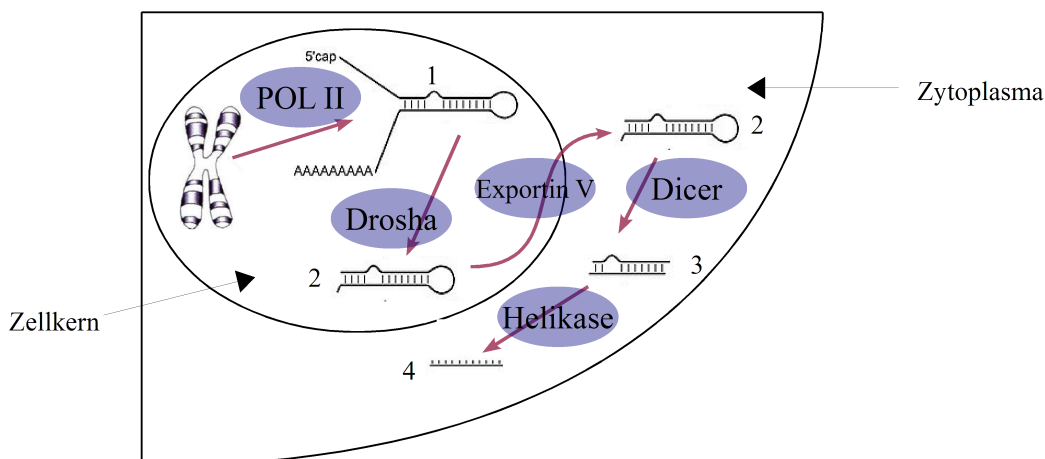


Abbildung 1: Biogenese der miRNAs.

Schematisch dargestellt ist die Transkription und Prozessierung der miRNAs. 1: pri-miRNA; 2: pre-miRNA; 3: miRNA-miRNA*-Duplex; 4: reife miRNA.

Die Transkription der miRNAs erfolgt durch die RNA Polymerasen (POL) II oder III [2-3]. Diese primären Transkripte (pri-miRNA) sind zwischen 500 – 2000 nt lang und weisen häufig eine 7-Methylguanidin-Cap-Struktur am 5' Ende sowie einen Poly-A-Schwanz am 3' Ende auf, was auf eine Transkription durch die POL II hinweist. Die Expression einiger miRNAs wird durch spezifische Transkriptionsfaktoren beeinflusst oder hängt von der Methylierung der Chromatinstruktur im Promotorbereich ab [4-5]. Dennoch weist die Regulation der miRNA-Transkription weniger allgemeingültige Schritte auf als die Regulation von mRNAs. Nach der Transkription (Abb. 1) erfolgt bereits im Kern ein erster Prozessierungsschritt durch den Drosha-DGCR8 Komplex. Die pri-miRNA formt eine Haarnadelstruktur, welche aus einem komplementären Doppelstrang, einer Ringstruktur an einem Ende und zwei überhängenden Strängen am anderen Ende besteht. Die RNase Drosha schneidet sowohl am 3'- als auch am 5'-Arm, elf Nukleotide vom Übergang des Doppel- zum Einzelstrang. DGCR8 übernimmt die Funktion eines Positionsgebers und legt die genaue Schnittstelle fest. Die Bearbeitung durch Drosha erfolgt bereits während der Transkription und vor dem Spleißen der (möglicherweise transkribierten) Protein-codierenden mRNA. Das Spleißen selbst wird durch das Schneiden durch Drosha nicht beeinflusst [6-7]. Dieser erste Prozessierungsschritt wird bei verschiedenen miRNAs durch unterschiedliche Faktoren reguliert. So wird eine Bindung der pri-miR-18a durch das heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) für die Prozessierung benötigt, nicht aber für die anderen miRNAs des gleichen Clusters [8]. Ebenso beeinflusst die Deaminierung von Adenosin (A) zu Inosin (I) durch ADAR1 und ADAR2 die Prozessierung verschiedener miRNAs, sowohl positiv als auch negativ [9-11].

Im Anschluss an diese erste Prozessierung erfolgt der Transport der entstandenen pre-miRNA aus dem Kern in das Zytoplasma. Dies wird durch einen Komplex aus Exportin-5 und Ran-GTP gesteuert und erfolgt unabhängig von Sequenz oder Struktur der pre-miRNA.

Allerdings wird eine definierte Länge des Doppelstranges sowie der 3' Überhang benötigt. Exportin-5 verhindert darüber hinaus den Abbau von pre-miRNAs im Kern [12].

Im Zytoplasma erfolgen nun weitere Prozessierungsschritte sowie die Zusammenlagerung des RISC. Zunächst erfolgt eine zweite Spaltung durch die Endonuklease Dicer und TRBP, welche einen ~ 22 Nukleotide langen Doppelstrang (ohne Schlaufe) mit einem zwei Nukleotide langem Überhang an jedem 3' Ende produziert (miRNA-miRNA*-Duplex). Im Anschluss wird der Doppelstrang durch verschiedene Helikasen (vermutlich miRNA spezifische) aufgetrennt und ein Strang degradiert (miRNA*), der andere in den RISC eingelagert (miRNA). Die Entscheidung, welcher Strang der miRNA* ist, hängt von der thermodynamischen Stabilität der Enden ab: der Strang mit dem weniger stabilen Nukleotid am 5' Ende des Duplexes wird in den RISC aufgenommen [13]. Diese zweite Prozessierung unterliegt ebenfalls vielfältigen Regulationsmechanismen. So kann z.B. das Argonaute Protein AGO2 bereits vor Dicer den 3' Arm der Schlaufe an einer Stelle schneiden, was zu einer effizienteren Prozessierung durch Dicer führt [14]. Eine Bindung der pre-let-7 miRNA durch die Lin-28 miRNA führt zu einer Polyuridylation und somit zu einer Degradierung der pre-let-7 miRNA ohne eine weitere Prozessierung durch Dicer.

Dieser allgemeine Prozess der Biogenese lässt jedoch einige Fragen offen, wenn man verschiedene Klonierungsstudien vergleicht. So konnten zwei Arbeiten Sequenzen detektieren, die von der sogenannten Referenz-Sequenz (ref.seq) der miRBASE abweichen [15-16]. Besonders deutlich wird dies in der Studie von Kuchenbauer *et al.*, die zeigen konnten, dass die in der miRBASE angegebenen Sequenzen nicht immer die am häufigsten vorkommende Sequenz ist [16]. Dies hat besonders Auswirkungen auf die Expressionsanalysen mittels Sonden bzw. Primer, die nur eine definierte Sequenz erkennen und von geringen Abweichungen leicht in ihrer Aktivität beeinflusst werden. So zeigten sich in den PCR-Untersuchungen von Kuchenbauer *et al.*, dass die Veränderung lediglich eines Nukleotides im Primer zu einer Veränderung von bis zu 2 Ct-Werten führen kann. Dies kommt vermutlich durch die Detektion von mehr als einer der sogenannten IsomiR zustande.

1.1.2 Wirkungsmechanismen der miRNAs

Die Wirkung der miRNAs wird über komplementäre Basenpaarung an die Ziel-mRNA vermittelt. Hierbei spielt in den meisten Fällen die sogenannte Seedsequenz aus den Nukleotiden 2-8 die entscheidende Rolle bei der Identifizierung der 3' UTR der Ziel-mRNA. Neben der miRNA selbst sind noch verschiedene Proteine des RISC für den durch miRNAs vermittelten Effekt auf das Proteom nötig.

Bisher wurden verschiedene Mechanismen postuliert, über die miRNAs in die Genregulation eingreifen. Der erste Weg entspricht der Wirkung von small interfering RNAs

(siRNA) und setzt eine perfekte Komplementarität der Sequenzen von mRNA und miRNA voraus, einige Fehlpaarungen können allerdings toleriert werden [17]. Dieser Weg ist eher in pflanzlichen Zellen anzutreffen, da eine perfekte Komplementarität zwischen mRNA und miRNA in tierischen Zellen selten vorzufinden ist. Als einziges Beispiel wurde bisher die Spaltung der HOXB8-mRNA durch die humane miR-196a beschrieben [17]. Eine Voraussetzung für die Spaltung der mRNA ist die Präsenz des Proteins AGO2 im RISC, das als einziges Mitglied der humanen Argonaut-Familie eine Endonuklease-Aktivität besitzt [18]. Nach der Spaltung werden beide Teile der mRNA durch zelluläre Mechanismen abgebaut. Die miRNA bleibt intakt und an den RISC gebunden, so dass eine weitere mRNA erkannt und der Spaltung zugeführt werden kann. Darüber hinaus greifen miRNAs in die Stabilität der mRNA ein, indem sie zu einer Deadenylierung am 3' Ende führen und es so zu einer Degradierung kommt [19].

In einem weiteren Mechanismus greifen die miRNAs in die Kontrolle der Translation ein und führen so zu einer veränderten Proteinexpression ohne Einfluss auf die mRNA selbst. Hierbei werden momentan verschiedene Angriffspunkte der miRNA diskutiert (zusammengefasst in [20]). Zum einen konnte gezeigt werden, dass miRNAs die Translationsinitiation beeinflussen, indem sie die Bindung des allgemeinen Translationsfaktors eIF4E an die 5'Cap-Struktur der mRNA verhindern [21]. Zusätzlich konnten Petersen *et al.* zeigen, dass miRNA Mimics zu einem vermehrten Abbruch der Translation am Stop-Codon führen [22]. Die Autoren schlossen hieraus, dass miRNAs eine frühzeitige Termination der Translation fördern. Eine dritte Hypothese von Nottrott *et al.* beschreibt die Akkumulation von Proteasen an die translatierenden Ribosomen durch miRNAs und somit einen cotranslationalen Proteinabbau [23].

Als eine weitere Funktion von miRNAs wurde in den letzten Jahren eine Aktivierung der Translation beschrieben. So konnten Vasudevan *et al.* zeigen, dass die Bindung von miRNAs in proliferierenden Zellen zu einer Hemmung, in ruhenden Zellen jedoch zu einer Aktivierung der Translation führen kann [24]. Darüber hinaus kann die miR-122 sowohl aktivierend als auch hemmend auf die Translation wirken, abhängig davon, ob die Bindung der mRNA an der 5' UTR oder 3' UTR erfolgt [25-26].

Die These, dass lediglich die Seedsequenz aus den Nukleotiden 2-8 für die Spezifität der miRNA entscheidend ist, wurde schon früh widerlegt. So konnten Liu *et al.* zeigen, dass die miRs 181a-1 und 181c, welche eine komplett identische Seedsequenz aufweisen und sich insgesamt nur durch ein Fehlen des Nukleotides 11 unterscheiden, nicht die gleichen Auswirkungen auf die frühe Entwicklung von T-Zellen haben. Somit muss die gesamte Sequenz der miRNA eine Rolle spielen [27]. Darüber hinaus konnten Shen *et al.* zeigen, dass die Bindung nicht zwangsläufig an einem der untranslatierten Ende vorliegen muss, sondern die Bindung der miRNA auch innerhalb des Transkriptes erfolgen kann [28].

Einen weiteren Hinweis auf die Vielfältigkeit der miRNAs lieferten Liu *et al.*, als sie 2008 zeigen konnten, dass nicht nur die Seedsequenz für die Aktivität der miRNA entscheidend ist,

sondern auch die Sequenz der pre-miRNA-Haarnadel. Durch gezielte Mutationen außerhalb der Sequenz der reifen miR-181a-1 konnten sie zeigen, dass diese Veränderungen zu einer unterschiedlichen Aktivität (sowohl positiv als auch negativ) im Luziferase-Assay führten [27].

1.1.3 Die microRNA 142

Die Sequenz der microRNA hsa-miR-142-3p (miR-142) wurde als potenzielle miRNA vorhergesagt und durch Klonierungsstudien belegt [29]. Im Unterschied zu den meisten anderen miRNAs können von der miR-142 beide Stränge der reifen miRNAs nachgewiesen werden. Das Gen der miR-142 liegt auf Chromosom 17q22. An gleicher Stelle liegt eine Integrationsstelle des HPV16 in Cervixkarzinomen [30]. Zusätzlich befindet sich ~ 50 Nukleotide hinter dem miRNA-Gen der Bruchpunkt einer Translokation aus den Chromosomen 8 und 17 [31]. Dies führt bei Translation zu einem Fusionsprodukt aus der miRNA und einem verkürzten MYC-Transkript, da die Struktur nicht mehr miRNA-spezifisch ist und somit vermutlich nicht weiter durch Drosha prozessiert wird [29]. Das angereicherte Fusionsprodukt führt zu einer aggressiven B-lymphatischen Leukämie (pro-B-ALL). Die Methyltransferase MLL1 (mixed-lineage-leukemia), die durch eine Methylierung am Lysin 4 des Histons 3 eine Aktivierung der Chromatinstruktur bewirkt, bindet ebenfalls an das humane miR-142 Gen [32]. Zum Zeitpunkt des Beginns der Dissertation war nicht bekannt, ob dies Auswirkungen auf die Aktivität des miRNA-Gens hat bzw. eine Veränderung der MLL Aktivität durch eine Translokation (siehe 1.2.3) zu einer veränderten miRNA-Expression führt.

Chen *et al.* beschrieben die Expression der miR-142 hauptsächlich in hämatopoetischen Geweben (Thymus, Milz und Knochenmark). Sie fanden nur eine sehr geringe (Lunge) bis gar keine miR-142-Expression in Gehirn, Herz, Leber, Niere und Muskel [33]. Innerhalb der Blutzellen zeigen B-Zellen und myeloische Zellen die höchste Expression. Diese Ergebnisse wurden von Landgraf *et al.* unterstützt, welche die miR-142 als eine von fünf microRNAs identifizierten, die spezifisch für hämatopoetische Zellen sind. Hier zeigten sich jedoch nur geringe Unterschiede in der Expression zwischen den einzelnen Zellpopulationen [34]. Die ektopische Expression der miR-142 führte zu einer vermehrten Bildung von T-Zellen, wohingegen es keine Veränderungen in der B-Zell-Population gab. Darüber hinaus konnten leichte Veränderungen in der Zusammensetzung der myeloischen Zellen beobachtet werden [33].

1.1.4 Die microRNA 181a

Die erste Beschreibung der hsa-miR-181a (miR-181a) erfolgte in neuronalen Zellen durch Dostie *et al.* [35]. Sie gehört zu einer Familie aus insgesamt vier miRNAs (miR-181a-d), von denen die miRs 181a und b sowie miRs 181 c und d jeweils in einem Cluster vorliegen. Alle Mitglieder weisen eine hohe Homologie auf und unterscheiden sich jeweils nur in zwei bzw. drei Nukleotiden (Abb. 2).

```

hsa-miR-181a AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU
hsa-miR-181b AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU
hsa-miR-181c AACAUUCAAC·CUGUCGGUGAGU
hsa-miR-181d AACAUUCAUUGUUGUCGGUGGGU

```

Abbildung 2: Sequenzen der miR-181-Familie.

Rot markiert sind jeweils die Unterschiede zur miR-181a

Im humanem Genom befinden sich zwei voneinander unabhängige Genloki für die miR-181a: der erste auf Chromosom 1q31.3, der zweite auf Chromosom 9q33.3 Beide befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft des Gens für die miR-181b, die zu 87 % homolog zur miR-181a ist; lediglich die Nukleotide 9, 10 und 21 sind unterschiedlich. Somit ist die als entscheidend geltende Seedsequenz der Nukleotide 2-8 bei beiden miRNAs gleich. Beide Gene liegen innerhalb eines Transkriptes, welches jedoch nicht proteinkodierend ist, so dass vermutet werden kann, dass beide miRNAs gemeinsam transkribiert werden [36-37]. Für die miRs 181c und d ist nur ein Genlokus vorhanden.

Chen *et al.* fanden in Mäusen die höchste miR-181-Expression im Thymus, gefolgt von Gehirn und Lunge. Sie war darüber hinaus schwach detektierbar in Knochenmark und Milz [38]. Die genauere Untersuchung einzelner Blutzellen zeigte eine starke Expression in reifen B-Zellen, alle anderen Zellen, einschließlich undifferenzierte Stammzellen zeigten eine schwächere Expression. Eine Überexpression der miR-181a in unreifen Vorläuferzellen führte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer vermehrten Bildung von B-Zellen, wohingegen die Bildung von T-Zellen geringfügig abnahm. In humanen Zellen ist die Expression der miR-181a in hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) am höchsten, sie ist jedoch auch in reifen Zellen detektierbar [34]. Eine erste Untersuchung über die Rolle der miR-181a in der T-Zell-Reifung haben Neilson *et al.* durchgeführt [39]. Sie fanden die stärkste Expression in CD4+/CD8+ doppelt positiven Vorläuferzellen (DP), während die verschiedenen, doppelt negativen Vorstufen alle eine schwache Expression aufwiesen. In reifen CD4+ Zellen war die Expression schwächer als in reifen CD8+ Zellen. Darüber hinaus haben sie verschiedene Zielgene der miR-181a untersucht und konnten zeigen, dass die miR-181a die 3' UTRs der Gene Bcl2, CD69 und TCR α negativ beeinflusst. Der Einfluss der miR-181a auf die Expression von CD69, einem frühen Marker der T-Zell-Aktivierung, sowie auf CD5 und die Stärke des T-Zell-Rezeptor-Signals wurde durch Li *et al.* bestätigt [40]. Da das Signal, das von CD69 ausgeht, von wesentlicher

Bedeutung für den Austritt der Lymphozyten aus dem Thymus ist, nimmt die miR-181a einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung und Funktion der T-Zelle.

Zu Beginn der Dissertation war die Rolle der miR-181a in akuten Leukämien nur wenig untersucht. Lediglich die Publikation von Debernardi *et al.* gab einen ersten Hinweis auf eine mögliche Rolle als biologischer Marker in der Diagnostik und Einteilung von akuten myeloischen Leukämien (AML) [41]. So konnten die Autoren zeigen, dass in 30 AML *de novo* Proben mit einem normalen Karyotyp die Expression der miR-181a mit dem morphologischen Subtyp korreliert. Patienten mit einem unreifen Subtyp (FAB M1 und M2, siehe 1.2.1)) zeigen eine signifikant höhere miR-181a Expression als Patienten mit reiferen Subtypen (FAB M4 und M5). Darüber hinaus zeigten sie bei den Patienten einen Zusammenhang zwischen der miRNA Expression und verschiedenen mRNAs, die potenzielle Zielgene der miR-181a darstellen. So zeigten die Autoren z.B. eine positive Korrelation zwischen der miR-181a Expression und der Expression von HMGB1. HMGB1 codiert für ein Protein, das sowohl an der Translationsregulation beteiligt ist, aber auch bei Freisetzung Zytokinfunktionen aufweist.

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden zur Rolle der miR-181a in hämatopoetischen Zellen funktionelle Untersuchungen mittels Antisense-Hemmung und Überexpression (Mimic) durchgeführt. Hierbei wurde neben dem Einfluss auf Proliferation, Apoptose und Nekrose auch die Expression verschiedener Zielgene untersucht. Im folgenden sind die Bindungen zwischen miRNA und mRNA sowie die Hintergründe dieser Zielgene dargestellt (Tabelle 1).

Tabelle 1: miRNA-mRNA-Bindestellen potenzieller Zielgene der miR-181a.

CD4	3`UTR	5`... UGCCUGCGGACCAGA –UGAAUGUA ... :
	miR-181a	3` UGAGUGGCUGUCGCAACUUACAA
HMGB1	3`UTR	5`... UUA AAGAAGACCUGA - - GAAUGUAU ... :
	miR-181a	3` UGAGUGGCUGUCGCAACUUACAA
TCL1	3`UTR	5`... CCAGGCCGGCGAGCCCUGUGGAUG ... : : : :
	miR-181b miR-181a	3` GGG UGGCUG UCG U UACUUACAA 3` GAG UGGCUG UCG C AACUUACAA
PTEN	3`UTR	5`... UGAGGGUUUUGAUUU - - - UGAAUGUU ... : :
	miR-181a	3` UGAGUGGCUGUCGCAACUUACAA

Die Expression des Oberflächenmoleküls CD4 ist ein Merkmal von T-Helfer-Zellen. Die mRNA besitzt zwischen den Positionen 74-81 eine potenzielle Bindungsstelle für die miR-181a

(Tabelle 1). Die darüber hinaus untersuchten Oberflächenmoleküle CD3, CD5, CD19, CD34, CD38, CD69 und HLA-DR stellen Reifungs- bzw. Aktivierungsmarker dar und wurden z.T. bereits als Zielgene der miR-181a beschrieben (CD5, CD69 von [40]).

HMGB1 ist ein Mitglied der Familie der High-mobility-group-box-Proteine. Es zählt somit zu den DNA-bindenden Proteinen und spielt in gesunden Zellen eine Rolle bei der Transkription. Es wird darüber hinaus von nekrotischen Zellen freigesetzt und übernimmt dann Zytokinfunktionen. Es konnte gezeigt werden, dass in akuten myeloischen Leukämien mit normalem Karyotyp die Expression des HMGB1 mit der miR-181a positiv korreliert [41]. Die mRNA besitzt zwischen den Nukleotiden 900-906 eine potenzielle Bindungsstelle der miR-181a (siehe Tabelle 1). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der miR181a auf die Expression des HMGB1 sowohl auf Protein- und auf mRNA-Ebene untersucht.

Der PI3K-Akt Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in der Weiterleitung von Signalen des Milieus außerhalb der Zelle an den Zellkern. Der Coaktivator TCL-1 (T cell leukemia 1) bindet an die Plekstrin-Homologiedomäne der Serin-Threonin-Kinase Akt und verstärkt so ihre Aktivierung [42]. Pekarsky *et al.* konnten bereits 2006 zeigen, dass TCL-1 in chronisch lymphatischen Leukämien (CLL) durch die miRs 181b und 29 negativ reguliert wird und ihre Expression in *de novo* Material invers korreliert [43]. Die Homologie der miRs 181a und 181b liegt bei 87 %, so dass vermutet wurde, die miR-181a könne einen ähnlichen Einfluss auf TCL1 haben und somit die Aktivität von Akt beeinflussen. Dies wurde durch Phosphospezifische Antikörper für Akt auf Proteinebene überprüft.

Das Protein PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle im PI3K-Akt-Signalweg, in dem es das sekundäre Signalmolekül PIP3 (Phosphatidylinositol- 3, 4, 5-trisphosphat) zu PIP2 (Phosphatidylinositol- 4, 5-bisphosphat) dephosphoryliert und somit die Aktivierung von Akt verhindert. PTEN besitzt ebenfalls zwischen den Nukleotiden 2310-2316 eine potenzielle miR-181a Bindungsstelle (Tabelle 1). Die Expression von PTEN wurde auf Proteinebene untersucht.

1.2 Akute Leukämien

Leukämien sind maligne Erkrankungen des blutbildenden Systems, die sich durch eine stark vermehrte Bildung klonaler Leukozyten, in der Regel funktionsunfähige Vorstufen (Blasten), auszeichnen. Diese unreifen Blasten vermehren sich unkontrolliert im Knochenmark und verdrängen die gesunde Blutbildung, wodurch es zu einer Anämie, Neutropenie und Thrombozytopenie kommt. Symptome sind Schwäche, Blutungs- und Infektionsneigung. Es wird je nach Verlauf unterschieden zwischen chronischen Leukämien, welche unbehandelt über mehrere Jahre verlaufen und zu Beginn oft symptomarm sind, und akuten Leukämien mit einem deutlich aggressiveren Verlauf. Darüber hinaus wird nach transformiertem Zelltyp in lymphatische und myeloische Leukämien unterschieden. Während die akute lymphatische Leukämie (ALL) die häufigste Form im Kindesalter ist, erkranken Erwachsene hauptsächlich an akuten myeloischen Leukämien (AML).

1.2.1 Die akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie ist charakterisiert durch eine klonale Proliferation unreifer, myeloischer Zellen. Sie ist vorwiegend eine Erkrankung des Alters, das mediane Alter bei Diagnosestellung liegt bei 63 Jahren. Bezogen auf die Gesamtpopulation beträgt die jährliche Inzidenz 3-5 Fälle pro 100.000 Einwohner, in der Altersgruppe der über 80-jährigen steigt sie allerdings auf 15-30 Fälle pro 100.000 Einwohner. Männer sind etwas häufiger von dieser Erkrankung betroffen als Frauen (1,4:1). Bekannte Risikofaktoren bei der Entstehung einer AML sind neben einer langjährigen Belastung mit Benzol auch die Behandlung mit verschiedenen Zytostatika (Etoposid, Alkylantien). Bei einem Teil der Patienten entwickelt sich die AML in Folge eines vorherigen Myelodysplastischen Syndroms (MDS).

Zur Diagnosestellung werden verschiedene morphologische, zytogenetische und molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt. Es existieren zwei unterschiedliche Systeme zur Klassifizierung: basierend auf Morphologie und Zytochemie (French-American-British Klassifikation (FAB)) bzw. klinischen Faktoren und Prognose (WHO Klassifikation). Als gesichert gilt die Diagnose, sofern folgende Merkmale auftreten: Ein Anteil unreifer Blasten von > 30 % (FAB) bzw. 20 % (WHO) und die Zuordnung der Blasten zur myeloischen Reihe durch Immunphänotyp und Zytochemie.

Die FAB Klassifikation beruht auf dem Ursprung der malignen Zellen und unterteilt die AML nach Reifegrad der Zellen mittels zytochemischer Anfärbungen der Blasten. In Tabelle 2 sind die acht Subtypen der FAB-Klassifikation aufgeführt.

Tabelle 2: Einteilung der AML nach FAB-Subtypen.

FAB	Bezeichnung	Häufigkeit (%)
M0	AML mit minimaler Differenzierung	5 - 10
M1	AML ohne Ausreifung	10 - 20
M2	AML mit Ausreifung	30 - 45
M3	Akute Promyelozyten-Leukämie	5 - 10
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	20
M5a	Akute Monoblasten Leukämie	5
M5b	Akute Monozyten Leukämie	5
M6	Akute Erythroleukämie	5
M7	Akute Megakaryoblasten Leukämie	5

Die Klassifikation der WHO erfolgt in vier Kategorien, abhängig von Zytogenetik und vorhergehenden Erkrankungen:

- AML mit charakteristischen genetischen Veränderungen
- AML mit myelodysplastischen Veränderungen
- AML durch vorhergehende Therapien ausgelöst
- AML nicht weiter kategorisiert

Darüber hinaus bieten zytogenetische Aberrationen eine gute Möglichkeit zur Einteilung nach Risikogruppen mit unterschiedlicher Prognose. Grimwade *et al.* konnten in einer Studie mit über 1600 Patienten drei Gruppen mit günstiger, intermediärer und ungünstiger Prognose identifizieren (Tabelle 3) [44]:

Tabelle 3: Zytogenetische Risikogruppen nach Grimwade *et al.* [44].

Risikogruppe	Aberrationen	5-Jahres-Überleben
Günstige Prognose	t(15;17), t(8;21), inv(16)	65 %
Intermediäre Prognose	normaler Karyotyp, + 8, + 21, + 22, 11q23, del (7q), del (9q), andere numerische Aberrationen, andere strukturelle Aberrationen	41 %
Ungünstige Prognose	komplex veränderter Karyotyp, - 7, - 5, abn (3q), del (5q)	14 %

Zusätzlich zu diesen Diagnose- und Prognosefaktoren sind in den letzten Jahren molekularbiologische Faktoren identifiziert worden, die besonders bei Patienten ohne zytogenetische Veränderungen eine Rolle spielen. So zeigen z.B. Patienten mit Mutationen in dem CEBPA Gen bzw. dem NPM1 Gen (ohne gleichzeitige FLT3-Mutation) eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit als Patienten ohne solche Veränderungen. Mutationen in dem FLT3-Gen, dem MLL Gen sowie eine Überexpression von BAALC oder des Transkriptionsfaktors ERG sind hingegen mit einer schlechten Prognose für die Patienten assoziiert [45].

1.2.2 Die akute lymphatische Leukämie

Die akute lymphatische Leukämie ist durch eine maligne Transformation lymphatischer Vorläuferzellen gekennzeichnet. Es können sowohl Zellen der B-Zell-Reihe als auch der T-Zell-Reihe entartet sein. Die Alterskurve lässt zwei Gipfel erkennen, von denen einer bei Kindern unter fünf Jahren liegt (5,3 Fälle pro 100.000 Einwohner), der zweite liegt bei 80 Jahren mit einer Inzidenz von 2,3 Fällen pro 100.000 Einwohner. Wie bei der AML sind auch bei der ALL Männer häufiger betroffen als Frauen (1,4:1), ebenso zählen auch Benzole, ionisierende Strahlen sowie Zytostatika zu den Risikofaktoren für das Auftreten einer ALL.

Die ALL wird anhand der entarteten lymphatischen Linie sowie dem Reifegrad der Blasten in drei Subgruppen unterteilt. Tabelle 4 gibt einen Überblick über Einteilung, Häufigkeit sowie charakteristische Marker der Subtypen [46]:

Tabelle 4: Immunologische Subtypen der ALL nach Hoelzer et al. [46].

Subtyp	Inzidenz	Charakteristische Oberflächenmarker
B-Vorläufer ALL	72 %	HLA-DR+; CD19+ u./o. CD79a+; CD22+
<ul style="list-style-type: none"> • pro-B-ALL • common ALL • prä-B-ALL 	<ul style="list-style-type: none"> 11 % 49 % 12% 	<ul style="list-style-type: none"> keine zusätzlichen Marker CD10+ CD10+/-; cyIgM+
Reife B-ALL	4 %	sIgM+; CD10+/-
T-Linien-ALL	24 %	cy o. sCD3+; CD7+
<ul style="list-style-type: none"> • Frühe T-ALL • Thymische T-ALL • Reife T-ALL 	<ul style="list-style-type: none"> 6 % 12 % 6 % 	<ul style="list-style-type: none"> CD2-; sCD3-; CD1a- CD2+; CD5+; CD1a+; sCD3+/- CD2+; CD5+; sCD3+, CD1a-

Die ALL weist in ca. 75 % der adulten Fälle charakteristische genetische Veränderungen auf, die sowohl prognostische als auch therapeutische Bedeutung haben. In 20 – 30 % der B-Vorläufer ALL ist das sog. Philadelphia-Chromosom nachweisbar, welches ein verkürztes Chromosom 22 darstellt [47]. Durch eine reziproke Translokation je eines langen Arms der Chromosomen 9 und 22 entsteht das Fusionsgen *bcr-abl*. Dies wird in das Fusionsprotein BCR-ABL translatiert und weist eine erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität auf als die ursprüngliche Abelson (ABL) Kinase [48]. Durch die kontinuierliche Kinase-Aktivität werden zahlreiche Signaltransduktionswege dysreguliert, was zu einer unkontrollierten Proliferation sowie verminderter Apoptose der Zellen führt [47].

Im Gegensatz zur AML sind bei der ALL die Risikogruppen durch verschiedene klinische Parameter definiert (Tabelle 5):

Tabelle 5: Hochrisikomerkmale der ALL nach Hoelzer et al. [46].

	B-Vorläufer ALL	T-Linien ALL
Alter	> 55 Jahren	> 65 Jahren
Leukozytenzahl	>30.000 / μ l	
Immunphänotyp	Pro B-ALL	Frühe T-ALL Reife T-ALL
Zytogenetik	t(9;22) t(4;11)	
Zeit bis CR	> 3 – 4 Wochen	

CR: komplette Remission

Bisher wurden als Ursache für die T-ALL verschiedene molekulare Faktoren identifiziert. So treten hier in 15 – 20 % der Fälle Mutationen im Notch1 Gen auf [49], das eine wichtige Rolle in der Reifung von CD4+ und CD8+ T-Zellen spielt. Darüber hinaus spielen unterschiedliche Transkriptionsfaktoren wie z.B. LMO1 und LMO2 sowie die Hox Gene HOX11 und HOX11L eine Rolle in der Leukämiegenese der T-ALL [50]. Etwa drei Prozent der ALL Fälle weisen eine Duplikation der juxtamembranen Domäne des FLT3 Gens auf [51]. Eine Mutation in der Tyrosin-Kinase-Domäne der FLT3 (D835/I836) ist in 18,2 % der Fälle von kindlicher Leukämie mit MLL Veränderungen bzw. in 21,5 % mit hyperdiploidem Karyotyp zu finden, nicht jedoch bei Patienten mit anderen Fusionsgenen [52].

1.2.3 Die Translokation 11q23

Translokationen, die das MLL1 Gen auf Chromosom 11q23 involvieren, treten in 5-6 % der AMLs und 7-10 % der ALLs auf und stellen ein intermediäres zytogenetisches Risiko bei AML bzw. ein hohes Risiko bei ALL Patienten dar [44, 53].

Das *MLL1*-Gen kodiert für eine Histonmethyltransferase, die das Histon H3 am Lysin 4 trimethyliert (H3K4- trimethyliert), was zu einer aktiven Chromatinstruktur führt [54]. Unter den durch die MLL1 beeinflussten Genen sind viele *HOX*-Gene, die eine wesentliche Rolle bei der normalen Hämatopoese spielen [55], aber auch z.B. das Gen der *miR-142* [32]. Die aminoterminalen Region des MLL1-Proteins enthält eine cysteinreiche Domäne zur DNA-Bindung mit der Erkennungssequenz CXXC, die durch zwei sich wiederholende CGXCXXC Motive gekennzeichnet ist. Dieses Motiv ist in vielen Chromatin-assoziierten Proteinen vorhanden und für Zielerkennung und Transaktivierung der MLL1 verantwortlich. Es erkennt nicht methylierte CpG Dinukleotide.

Bisher konnten mehr als 100 Partnergene identifiziert werden, die bei einer Translokation ein Fusionsprodukt mit der MLL1 bilden. Besonders häufig sind dabei neun Gene zu finden: *AF4*, *AF9*, *ENL*, *AF10*, *AF6*, *ELL*, *AF1P*, *AF17* und *SEPT6*. Bei kindlicher ALL liegt der Bruchpunkt im Intron 11 des MLL Gens, bei Erwachsenen mit einer ALL und bei einer AML liegt er im Intron 9 [56].

ALL-Zellen mit Translokationen des MLL-Gens weisen viele Unterschiede in der Genexpression gegenüber Zellen ohne MLL-Veränderungen auf. So zeigen sie eine fehlende Expression von CD10 (lymphoide Vorläuferzellen) [57], eine Koexpression der myeloiden Antigene CD15 und CD65 [57] und eine Expression des Proteoglykans NG2 [58]. Darüber hinaus wurde mithilfe von mRNA Microarrays ein einzigartiges Genexpressionsprofil erstellt, mit dem eine Unterscheidung zwischen ALL und AML jeweils mit und ohne MLL-Aberrationen möglich ist [59].

Zielstellung

MiRNAs stellen seit ihrer Erstbeschreibung einen neuen und viel versprechenden Ansatzpunkt im Verständnis zur Entstehung verschiedenster Krankheiten dar. Aufgrund ihrer erst kürzlichen Entdeckung war die Datenlage zu Beginn der Dissertation besonders bezüglich der miRNA Expression in akuten Leukämien begrenzt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten sowohl Expressionsstudien als auch funktionelle Untersuchungen durchgeführt werden, um ein besseres Verständnis der Zusammenhänge zwischen miRNA-Dysregulationen und akuten Leukämien zu erreichen.

In einem ersten Teilbereich sollte ein miRNA-Expressionsprofil verschiedener hämatopoetischer Zellen erstellt werden. Hierbei wurde der Fokus auf die Identifizierung von miRNAs gelegt, die eine Dysregulation im Zusammenhang mit einer Translokation 11q23 zeigen und so für diese Subgruppe der akuten Leukämien von besonderer Bedeutung sind.

Parallel wurde die Etablierung der miRNA-Bestimmung über quantitative Real-Time PCR angestrebt, um die Expression von zwei spezifischen miRNAs in verschiedenen Zellpopulationen sowie *de novo* Material ermitteln zu können. Für diese Analysen wurden die miRNAs 142 und 181a aufgrund der zu diesem Zeitpunkt publizierten Literatur ausgewählt. Die Expression beider miRNAs in *de novo* Material sollte auf Zusammenhänge mit morphologischen, zytogenetischen und prognostischen Faktoren der akuten Leukämien hin untersucht werden.

Ein dritter Schwerpunkt der Arbeit lag in funktionellen Untersuchungen zur Rolle der miR-181a in akuten Leukämien. Hierzu erfolgte die Etablierung einer miRNA-Inhibition und -Überexpression mittels Antisense- bzw. Mimic-Technologie. Die Auswirkungen der Modulation der miRNA-Expression sollten über verschiedene zellbiologische, immunologische, molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden erfolgen. Die Priorität lag in der Untersuchung der Zellproliferation, Apoptose und Nekrose sowie der Expression verschiedener potenzieller Zielgene der miR-181a.

Ziel war es, durch die so ermittelten Ergebnisse zu einer erweiterten Erkenntnis über die Beziehung von miRNA Fehlregulationen und der Entstehung von akuten Leukämien zu gelangen. Es sollten mögliche diagnostische und prognostische Faktoren sowie potenzielle therapeutische Ansätze auf miRNA-Ebene zur Behandlung akuter Leukämien ermittelt werden.

2. Methoden

Alle Arbeiten erfolgten nach den Standards der Guten Laborpraxis. Für alle Arbeiten mit RNA/DNA wurden Nuklease-freie Reaktionsgefäße verwendet und, sofern nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt.

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Kultivierung humaner Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen und steril bei den empfohlenen Bedingungen kultiviert. Genauere Informationen wie zytogenetische Aberrationen, Subtypen und Ausgangsmaterial sind im Anhang zusammengestellt (s. 6.2).

2.1.2 Isolierung von MCs aus humanem Knochenmark und peripherem Blut

Zur Gewinnung von *de novo* Material wurden die mononukleären Zellen (MCs) aus Knochenmark bzw. peripherem Blut mittels Dichgradientenzentrifugation isoliert. Die Verwendung von Patientenmaterial erfolgte nach schriftlichem Einverständnis der Patienten bzw. aus Überschussmaterial.

Hierzu wurde das Material nach der Entnahme mit einem Volumen kaltem PBS gemischt, auf ein Volumen Ficoll ($d = 1,077 \text{ g/ml}$) überschichtet und bei 1200 g für 12 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Während der Zentrifugation trennen sich die Zellen nach ihrer Dichte auf und können getrennt isoliert werden.

Der MC-Ring wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und mit 10 ml kaltem PBS bei 200 g, 10 min und 4 °C gewaschen. Alle weiteren Waschschrte erfolgten, sofern nicht anders angegeben, bei diesen Einstellungen. Wies das Pellet nach einem weiteren Waschschrte eine leicht rötliche Farbe auf, wurde eine Erythrozytenlyse durch 10 minütiges Inkubieren bei 37 °C mit 0,25 M NH_4Cl -Lösung durchgeführt und anschließend erneut zwei mal mit je 10 ml kaltem PBS gewaschen.

Die Zellen wurden gezählt (2.1.4.). Maximal 10 Mio. Zellen wurden abzentrifugiert, in 700 μl Qiazol Lyse-Reagenz aufgenommen und bei -80 °C bis zur Isolierung der RNA (2.2.1.) gelagert.

Als Kontrolle wurden von gesunden Probanden ebenfalls Granulozyten isoliert. Hierzu wurden die Erythrozyten und Granulozyten nach der Dichtegradientenzentrifugation entnommen

(die unterste Schicht), mit 40 ml 0,25 M NH₄Cl-Lösung versetzt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte, das Zählen der Zellen sowie das Lysieren der Zellen in 700 µl Qiazol Lyse-Reagenz je 10 Mio. Zellen.

2.1.3 Anreicherung spezifischer Zellpopulationen

Um eine reine Zellpopulation aus einer gemischten Lymphozyten/Monozyten-Population zu gewinnen, wurde nach der Isolierung der Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation (siehe 2.1.2) eine Anreicherung mittels magnetischer Zellsortierung (MACS; Magnetic-Activated-Cell-Sorting) vorgenommen. Die MCs wurden von gesunden Probanden isoliert bzw. im Fall der hämatopoetischen Stammzellen von Patienten, welche keine Knochenmarkserkrankung aufwiesen. Als reine Populationen wurden folgende Zelltypen isoliert:

- Hämatopoetische Stammzellen (CD34+ Zellen; HSZ)
- Monozyten (CD14+ Zellen)
- B-Lymphozyten (CD19+ Zellen)

Nach der Bestimmung der Zellzahl im Anschluss an die Dichtegradientenzentrifugation wurde eine Probe zur Bestimmung der Populationsverteilung mittels Durchflusszytometrie entnommen (~5x10⁵ Zellen). Mit den übrigen Zellen erfolgte eine Inkubation mit einem Antikörper, bzw. einem an einen Antikörper gekoppelten Magnetpartikel. Die Charakteristika der verschiedenen Inkubationsschritte sind in Tabelle 6 aufgeführt:

Tabelle 6: Verwendete Antikörper und Micro-Beads zur Isolierung hämatopoetischer Zellen.

Zell-Population	Volumen MRB	Primäre Inkubation	Verdünnung	Sekundäre Inkubation	Verdünnung	Programm
CD34+	300 µl / 1x10 ⁸ Gesamtzellen	Anti-CD34+ Micro-Bead	100 µl / 1x10 ⁸ Gesamtzellen	-	-	Possel_D
CD14+	MRB : Bead = 5:1	Anti-CD14+ Micro-Bead	20 µl / 1x10 ⁷ Gesamtzellen	-	-	Possel
CD19+	300 µl / 1x10 ⁸ Gesamtzellen	Anti-CD19 - FITC-Antikörper	10 µl / 1x10 ⁶ Ziel-Zellen	Anti-FITC Micro-Bead	10 µl / 1x10 ⁷ Gesamtzellen	Possel

Die Zellen wurden nach dem Zählen abzentrifugiert, in MACS-Running-Buffer (MRB) aufgenommen und für 15 min (CD14+/CD19+) bzw. 30 min (CD34+) mit der entsprechenden Menge Antikörper bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 1 ml MRB aufgenommen. Für die CD19+ Zellen erfolgte nun der zweite Inkubationsschritt mit dem anti-FITC Micro-Bead, sowie ein erneutes Waschen. Die magnetische Isolation erfolgte mit Hilfe des Auto-MACS (Miltenyi Biotech). Im Anschluss an die Anreicherung wurden die Zellen erneut gezählt (2.1.4). Die Reinheit der Positiv- als auch der Negativ-Fraktion wurde mittels Durchflusszytometrie (2.3.1) bestimmt.

2.1.4 Bestimmung der Zellzahl und -vitalität

Mittels Trypanblau und Neubauerzählkammer wurde die Vitalität sowie die Anzahl der Zellen bestimmt. Trypanblau ist ein Diazo-Farbstoff, der nicht durch die intakte Zellmembranen in das Zytoplasma vitaler Zellen eindringen kann, die geschädigte Membran einer toten Zelle jedoch durchdringt. Somit erscheinen vitale Zellen farblos, tote Zellen jedoch blau im Lichtmikroskop.

2.1.5 Transfektion von Zelllinien mittels Elektroporation

Die Elektroporation ist eine physikalische Transfektionsmethode, bei der die Zellmembran durch elektrische Impulse permeabilisiert wird, so dass die sich in der Lösung befindlichen Oligonukleotide in die Zelle eindringen können. In der vorliegenden Arbeit wurden für die spezifische Hemmung Antisense-Oligonukleotide (ASO) verwendet, die eine komplementäre Sequenz zu der reifen miR-181a aufweisen verwendet. Es wurden sowohl unmodifizierte als auch chemisch modifizierte (Locked-nucleic-acid, LNA, Abb. 3) Oligonukleotide (Oligos) transfiziert, da diese eine größere Stabilität innerhalb der Zelle und eine höhere Bindeaffinität zur Ziel-miRNA aufweisen. Für die Überexpressionsexperimente wurden Oligonukleotide mit der gleichen Sequenz wie die reife miR-181a verwendet. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz (2.3.2) wurde zusätzlich mit einem fluorochrom-markiertem (FITC) unspezifischen Oligonukleotid transfiziert. Die genauen Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind im Materialteil (9.16) aufgeführt.

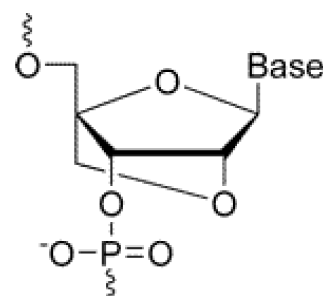


Abbildung 3: Struktur des LNA-modifizierten Ribosemoleküls.

Dargestellt in der Haworth-Projektion.

Vor der Elektroporation wurden die Zellen zwei mal mit Medium ohne Zusätze bei 180 g gewaschen (4°C, 8 min) und gezählt. Anschließend wurde eine Zellzahl von 10 Mio. Zellen in 300 µl eingestellt. In die gekühlte Elektroporationsküvette wurden 12,5 µg Oligonukleotid, bzw. ein entsprechendes Volumen steriles Wasser (LNA-Oligos) oder Suspensionspuffer (unmodifizierte Oligos) als Mock-Kontrolle, vorgelegt, mit 300 µl Zellsuspension vorsichtig vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden bei 960 µFD und 300 V in einem Gene Pulser (BioRad) elektroporiert. Nach einer weiteren Inkubation von 10 min auf Eis wurden die Zellen in einer 6-Lochplatte mit 8 ml Kompletmedium ausgesät. Die Aufteilung auf vier Zeitpunkte (15h, 24h, 48h, 72h) erfolgte nach 60 min

Zu den genannten Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, die Zellzahl bestimmt, sowie Proben für die miRNA-Expression (2.2), die Expression des HMGB1 (2.2 und 2.4), Bestimmung der Oberflächenmarker (2.3.1) und Bestimmung der Apoptoserate (2.3.3) entnommen.

2.1.6 Bestimmung der Zellviabilität mittels WST-1

Der WST-1 Assay (*Water soluble tetrazolium*) dient dem Nachweis einer intakten Atmungskette und ist somit ein indirektes Maß für die Zellproliferation. Viable Zellen mit einem intakten mitochondrialen Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase-System bewirken eine enzymatische Umsetzung des schwach rot gefärbten Tetrazoliumsalzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) in das dunkelrote Formazan. Dieser Farbumschlag kann in einem Spektralphotometer photometrisch gemessen werden.

Nach der Transfektion wurden von jedem Ansatz Zellen entnommen und auf eine Zellzahl von 0,33 Mio. Zellen je Milliliter eingestellt. Hiervon wurden je 150 µl in eine 96-Lochplatte gegeben. Als Blindwert dient reines Medium. Nach 24, 48 und 72 h wurden je 15 µl WST-1 zu den Zellen gegeben und nach 2 – 4 h die Absorption bei 450 und 650 nm gemessen. Es wurde zu jedem Zeitpunkt eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA und Konzentrationsbestimmung

Die Isolierung der Gesamt-RNA einschließlich kleiner RNAs wie microRNAs aus Patientenmaterial oder Zelllinien erfolgte mit dem miRNeasy-Kit (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers.

Maximal 10 Mio. Zellen wurden in 700 µl Qiazol Lyse-Reagenz lysiert, so dass keine Zellreste mehr erkennbar waren. Anschließend wurde das Lysat bei -80 °C bis zur Aufbereitung gelagert oder für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und sofort weiter verarbeitet. Eingefrorene Lysate wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Das Lysat wurde mit 140 µl Chloroform versetzt, gründlich gemischt, für 2 – 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 4 °C, 12000 g für 15 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Schicht wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, ohne dass etwas von der weißlichen, Proteine-enthaltenden Schicht oder der rosafarbenen, Chloroform-haltigen Schicht mit überführt wurden. Die Lösung wurde mit 1,5 Volumen 96 % Ethanol (unvergällt) versetzt, gründlich gemischt und auf eine RNeasy Mini Spin Column gegeben. Die RNA bindet selektiv an die Silika-Membran der Säule und konnte durch mehrere Waschschriffe aufgereinigt werden. Um eventuelle Kontaminationen mit genomischer DNA zu vermeiden wurde ein fünf minütiger DNase-Verdau durchgeführt. Es wurde zwei Mal mit je 20 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Nanodrop ND 1000 Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm.

2.2.2 Reverse Transkription der microRNAs

Für die quantitative Bestimmung der miRNA-Expression erfolgte zuerst die Umschreibung in cDNA, die Reverse Transkription (RT). Hierbei wurde auf die Technik der Firma Applied Biosystems zurück gegriffen, die einen sogenannten Stemloop-Primer verwendet, um die geringe Größe der miRNAs zu kompensieren (siehe Abb. 4) [60]. Hierbei wird ein im Verhältnis zur miRNA deutlich längerer, eine Haarnadel bildender Primer verwendet, welcher an die miRNA bindet und einen Teil der gebildeten cDNA darstellt. Bei der anschließenden quantitativen PCR (qPCR) liegt somit ein deutlich längeres cDNA-Produkt zur Amplifikation vor, was die Platzierung von Primern und Sonde erleichtert. Zu beachten ist, dass für jede microRNA ein eigener Ansatz gemacht werden musste, da für jede miRNA spezifische Primer vorlagen.

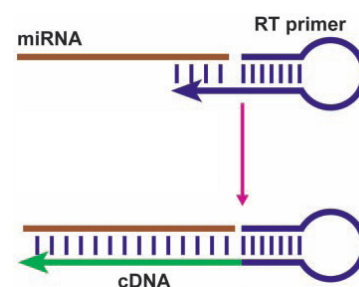


Abbildung 4: Schematischer Ablauf der Reversen Transkription der miRNAs.

Dargestellt ist die Transkription von miRNAs zu cDNA mittels Stemloop-Primern nach Chen et al. [60].

Hierzu wurde die RNA so verdünnt, dass in 5 μ l 10 ng RNA enthalten waren. Mit den in Tabelle 7 angegebenen Reagenzien wurden ein MasterMix angesetzt und 10 μ l MasterMix zu jeder RNA-Probe pipettiert.

Tabelle 7: Pipettierschema für den MasterMix der microRNA RT-PCR.

Reagenz	Konzentration	Volumen (μ l) / Ansatz
Nuklease-freies Wasser		4,16
RT - Puffer	10 - fach	1,5
RT - Primer		3
dNTP	100 mM	0,15
RNase-Inhibitor	200 U/ μ l	0,19
MultiScribe RT	50 U/ μ l	1
Total		10

Anschließend wurden die Proben zuerst für 30 min bei 16 °C inkubiert, dann für 30 min bei 42 °C, gefolgt von 5 min bei 85 °C. Die cDNA wurde bei 4 °C bzw. - 20 °C gelagert.

2.2.3 DNase-Verdau und Reverse-Transkription für mRNAs

Auf mRNA-Ebene wurde die Expression des *High-mobility-group-box 1* (HMGB1) Gens untersucht. Da im humanem Genom verschiedene Pseudogene des HMGB1 existieren, musste vor der Expressionsbestimmung sicher gestellt sein, dass die verwendete RNA DNA-frei war.

Hierzu wurde ein zweiter enzymatischer DNA-Verdau vorgenommen. Anschließend erfolgte die Umschreibung in cDNA mittels sogenannter Random-Primer, Hexamer-Oligonukleotiden, die eine zufällige Sequenz besitzen.

Ein 50 µl Ansatz enthielt 5 µl 10 x Turbo DNase Puffer, 1 µl Turbo DNase (2 U/µl) und bis zu 5 µg RNA. Fehlendes Volumen wurde mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 20 min bei 37 °C inkubiert, anschließend mit 0,1 Volumen DNase Inaktivierungsreagenz versetzt und für drei Minuten bei RT inkubiert. Es folgte eine drei minütige Zentrifugation bei 14000 g, um den weißlichen Niederschlag zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, erneut zentrifugiert (3 min, 14000 g) und der Überstand nochmals in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die RNA zu fällen, wurden 2 µl Glykogen, 0,5 Volumen Ammonium-Acetat und 300 µl Ethanol (96 %, unvergällt) zugesetzt und gemischt. Das Reaktionsgefäß wurde in flüssigem Stickstoff schock gefroren und anschließend bei 17500 g bei 0 °C für 60 – 90 min zentrifugiert. Das Pellet wurde zwei Mal mit 70 % Ethanol gewaschen und für 15 min bei 17500 g bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in Vakuum getrocknet und in 10 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst. Es folgte eine Konzentrationsbestimmung, s. 2.2.1.

Zwischen 5 und 50 ng RNA in einem Volumen von 9 µl wurden mit 1 µl Random Primern versetzt, für 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Es folgte die Zugabe von 4 µl 5-fach RT-Puffer, 2 µl dNTPs, 2µl DTT und 1 µl SuperScript II. Der Ansatz wurde für 60 min bei 42 °C inkubiert, im Anschluss für 10 min auf 95 °C erhitzt, um eine Inaktivierung der Reversen Transcriptase zu bewirken und auf Eis abgekühlt. Die cDNA wurde bei 4 °C bzw. -20 °C gelagert.

2.2.4 *Quantitative Real-Time-PCR*

Mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR können DNA-Fragmente nicht nur vervielfältigt, sondern auch quantifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden hierfür sogenannte TaqMan[®]-Sonden verwendet, welche den Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer Effekt (FRET) auszunutzen. TaqMan[®]-Sonden sind Oligonukleotide, die innerhalb des Amplifikates binden und an beiden Enden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Der eine Farbstoff (Donor) wird von einer Lichtquelle angeregt und emittiert einen Teil dieser Energie bei einer anderen Wellenlänge, welche wiederum von dem zweiten Farbstoff (Akzeptor) aufgenommen wird. Dieser Effekt ist nur bei einer engen räumlichen Nähe möglich. Im Laufe der PCR wird dieses Oligonukleotid durch die 5'-3' -Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase proportional zur neu synthetisierten DNA abgebaut. Dadurch kann das vom Donor emittierte Licht aufgrund der größeren räumlichen Entfernung vom Akzeptor nicht mehr angenommen werden, was zu einer Zunahme des Fluoreszenzsignales des Donors führt. Dieses wird am Ende

der Elongation eines jeden Zyklus gemessen und zur Quantifizierung verwendet.

Die Expression der Gene wurde auf die Expression eines Haushaltsgens normalisiert (relative Quantifizierung). Darüber hinaus wurden die Proben auf einen Kalibrator bezogen und die n-fache Expression im Vergleich zu diesem Kalibrator errechnet. Als Kalibratoren wurde die Expression in hämatopoetischen Stammzellen (für die Bestimmung in Patientenmaterial und Zelllinien) bzw. die Expression der Kontrolle des jeweiligen Zeitpunktes (im Verlauf eines Transfektionsversuches) verwendet. Die PCRs der einzelnen Gene/Haushaltsgene verlaufen mit unterschiedlichen Effizienzen (3.3). Um diese auszugleichen und gleichzeitig eine statistische Auswertung vorzunehmen, wurde die Auswertung mit dem Relative Expression Software Tool (REST) [61][62] vorgenommen. Dieses berechnet unter Verwendung des „Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test“[©] eine Veränderung der Genexpression im Vergleich zur Expression in der Kontrolle (Kalibrator). Standard parametrische Tests wie der t-Test gehen von einer Normalverteilung der Daten aus, die bei experimentellen Daten nicht immer gegeben ist. Diese Annahme wird von randomisierten Tests nicht gemacht. Der verwendete Test verteilt die Werte der zwei Gruppen zufällig neu und errechnet aus den Expressionsverhältnissen einen p-Wert. Es wurden 2000 – 5000 Berechnungen durchgeführt. Zusätzlich ist die hier verwendete Variante des Tools in der Lage, eine Fehlerfortpflanzung mittels Taylor-Entwicklung durchzuführen.

Die PCR wurde in einer 96-Lochplatte durchgeführt. Jede Probe wurde 3-fach aufgetragen. Zusätzlich wurde eine No Template Control (NTC) für jeden MasterMix mitgeführt, um zu überprüfen, ob die Reagenzien mit cDNA kontaminiert waren. Bei der Bestimmung des HMGB1 wurde zusätzlich von jeder Probe die RNA aufgetragen, um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen.

Es wurde für jede microRNA folgender MasterMix angesetzt (Tabelle 8):

Tabelle 8: Pipettierschema für den MasterMix (a) sowie Programm (b) der miRNA qPCR.

a)	Reagenz	Volumen (µl) / Ansatz	b)	Temperatur	Zeit	
	2-fach MasterMix (inkl. Enzym)	10		95 °C	10 min	
	20 x TaqMan miRNA Assay	1		95 °C	15 sek	40 x
	Nuklease-freies Wasser	7,67		60 °C	60 sek	
	Total	18,67				

In jedes Well wurden 1,33 µl RT-Produkt vorgelegt und anschließend mit 18,67 µl MasterMix versetzt. Die Platte wurde mit einer Optical Adhesive Cover Folie versiegelt, für 30 sek zentrifugiert, um eventuell am Rand des Lochs befindliche Tropfen zu sammeln. Die PCR wurde an einem ABI PRISM SDS 7000 Gerät der Firma Applied Biosystems mit dem in Tabelle 8 angegebenem Programm durchgeführt. Die Datenerfassung erfolgte bei 60 °C.

Für die quantitative Bestimmung des HMGB1 wurde folgender MasterMix angesetzt (getrennt für HMGB1 und Glucuronidase):

Tabelle 9: Pipettierschema für die HMGB1-qPCR.

Reagenz	Volumen (µl) Ansatz
MasterMix (inkl. Enzym)	10
Primer Forward	1
Primer Reverse	1
Sonde	1
Nuklease-freies Wasser	2
Total	15

Es wurden 5 µl RT-Produkt/RNA in jedes Loch vorgelegt und mit 15 µl MasterMix versetzt. Die weitere Durchführung der PCR ist identisch mit jener für die Bestimmung der miRNAs (s. oben), es wurden jedoch 45 statt 40 Zyklen durchgeführt.

2.2.5 MiRNA-Microarrays

Um einen generellen Überblick über die Expression von miRNAs in hämatopoetischen Zellen zu gewinnen wurden miRNA-Microarrays durchgeführt.

Hier bei wurden Microarrays der Firma Exiqon verwendet. Diese setzt ebenfalls LNA-modifizierte Oligonukleotide (Abb. 3) ein, die eine höhere Sensitivität und Spezifität gegenüber nicht-modifizierten Oligonukleotiden aufweisen. Es wurde die miRNA-Expression von drei Zelllinien (SEM, RS4;11, MV4;11), welche neben anderen die gleiche zytogenetische Aberration aufweisen [t(4;11)(q21;q23)], mit der Expression in hämatopoetischen Stammzellen und in CD19+ B-Zellen verglichen. Die experimentelle Durchführung und Nachbearbeitung erfolgte bei der Firma Exiqon. Die Planung und Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dipl. Math. Anne Glass (Institut für medizinische Informatik und Biometrie, Universität Rostock) und Frau Dipl. Bioinf. Sonja Boldt (AG Systembiologie und Bioinformatik, Universität Rostock).

Von jeder Population wurden drei unabhängige Proben genommen und die Gesamt-RNA isoliert. Es wurde eine Zwei-Farben-Analyse durchgeführt, bei der als Referenz eine Mischung mit gleichen Anteilen aller Proben verwendet wurde (common reference). Nach der Hintergrundkorrektur wurden die Signale mittels der nicht linearen LOWESS Regression (LOcally WEighted Scatterplot Smoothing) normalisiert (Abb. 5).

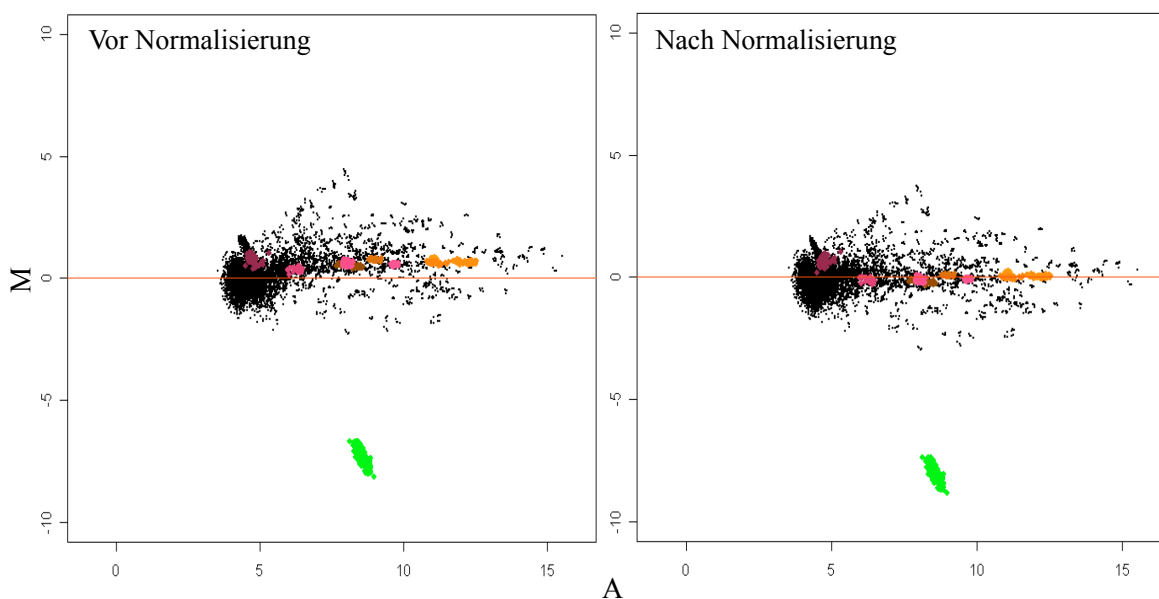


Abbildung 5: Normalisierung der Microarray-Slide.

Beispielhaft dargestellt an einem Slide. M ist die Differenz der Signale aus beiden Kanälen ($\log_2(\text{Hy5}/\text{Hy3})$). A ist die mittlere Signalstärke beider Kanäle ($\log_2(\text{Hy5} * \text{Hy3}/2)$).

Dieser Algorithmus geht von der Annahme aus, dass die Mehrheit der Gene nicht unterschiedlich exprimiert wird, er macht jedoch nicht die Annahme, dass die gleiche Anzahl an Genen hoch bzw. runter reguliert ist. Gene, welche in drei der vier Replikate eines Arrays ein Signal unterhalb der Hintergrundes aufwiesen, wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

Eine veränderte Expression wurde mittels zweiseitigem t-Test auf Signifikanz geprüft und diese bei einem Wert unter $p < 3,95 \times 10^{-5}$ angenommen. Dieser Wert ist so gering, da aufgrund der hohen Probenzahl die Bonferroni-Korrektur durchgeführt wurde, um das Signifikanzniveau anzupassen ($p = 0,05 / 1265 \text{ miRNAs} = 3,95 \times 10^{-5}$).

Von den signifikant veränderten miRNAs wurden einige (40%) ausgewählt und die vorhergesagten, potenziellen Ziel-mRNAs aus zwei Datenbanken [targetscan (www.targetscan.com) und miRCosm (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>)] heraus gesucht und die Ergebnisse beider Datenbanken miteinander verglichen. Für eine weitere Betrachtung wurden nur die Zielgene berücksichtigt, welche in beiden Datenbanken aufgeführt waren. Bekannte Funktionen dieser Gene wurden über Uniprot (www.uniprot.org) oder Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) ermittelt.

2.3 Durchflusszytometrie

2.3.1 Bestimmung von Oberflächenantigenen

Die Durchflusszytometrie stellt ein Verfahren dar, mit dessen Hilfe sich Zellen hinsichtlich ihrer Größe, der Granularität, der Expression von Oberflächenantigenen, aber auch von intrazellulären Molekülen charakterisieren lassen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Expression von Oberflächenantigenen nach einer Anreicherung (2.1.3) als Maß der Reinheit und im Verlauf einer Transfektion (2.1.5), der Transfektionseffizienz (2.3.2) sowie zur Messung der Apoptose- und Nekrose-Rate (2.3.3) im Verlauf einer Transfektion angewendet.

Die Messungen wurden mit einem FACSCalibur der Firma Becton & Dickinson (BD) vorgenommen. Die Steuerung und Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software CellQuest Pro 4.0.2 (BD). Detaillierte Angaben zu den verwendeten Antikörpern befinden sich im Material-Teil (9.16).

Zur Bestimmung der Reinheit nach einer Anreicherung wurde sowohl von den Zellen vor der Anreicherung als auch von der Positiv- und der Negativ-Fraktion die Expression eines für die Population spezifischen Antigens (CD34, CD19, CD14) ermittelt.

Im Verlauf einer Transfektion wurde die Expression derjenigen Oberflächenantigene untersucht, die als potenzielles Zielgen der miR-181a beschrieben wurden (CD69, CD33, CD4), von denen bereits eine Beeinflussung durch die miR-181a beschrieben wurde (CD69, CD5) [40] oder die verschiedene Aktivierungs- und Differenzierungs-Marker darstellen (CD3, CD19, HLA-DR, CD34, CD38). In Tabelle 10 ist das genaue Messprotokoll aufgeführt.

Tabelle 10: Messprotokoll der Oberflächenantigene im Verlauf eines Inhibitionsversuches.

Ansatz	AK FITC	AK PE
1	Maus IgG1	Maus IgG1
2	Maus IgG1	CD38
3	CD45	Maus IgG1
4	CD69	CD3
5	CD19	CD5
6	CD20	CD33
7	HLA - DR	CD4
8	CD34	CD38

2.3.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Um die Aufnahme der Oligonukleotide in die Zellen nach der Transfektion zu messen wurde der Ansatz, welcher mit dem FITC-markierten Oligonukleotid behandelt wurde, nach Ablauf der Inkubationszeit geerntet, bei 180 g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert, in 500 µl PBS resuspendiert und in ein Messröhrchen überführt.

Die Einstellung im Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) erfolgte so, dass nur vitale Zellen in die Messung mit einbezogen wurden. Der Anteil an grün fluoreszierenden Zellen wurde unter Abzug der Eigenfluoreszenz der Zellen ermittelt [63].

2.3.3 Apoptose - und Nekrosenachweis

Apoptose und Nekrose stellen die beiden Hauptmechanismen des Zelltods dar. Während die Apoptose als programmierter Zelltod bezeichnet wird und durch verschiedene Mechanismen innerhalb der Zelle ausgelöst wird, ist die Nekrose die Reaktion der Zelle auf Schädigungen von außen wie Verletzungen, Vergiftungen oder Nährstoff- und Sauerstoffmangel.

Annexin V ist ein kalziumabhängiges, phospholipid-bindendes Protein, welches eine starke Affinität zu Phosphatidylserin besitzt. Phosphatidylserin ist ein Membranprotein, das sich bei vitalen Zellen auf der Innenseite der Membran befindet. Zu Beginn der Apoptose wird es durch die Lipidschicht auf die Außenseite der Membran transloziert, wo es von Annexin V gebunden werden kann, weshalb dieses Protein als Indikator für apoptotische Zellen dient. Da allerdings die Membran von nekrotischen Zellen permeabel ist, kann Annexin V auch in diese Zellen eindringen und das auf der Innenseite der Membran liegende Phosphatidylserin anfärben. Um in der Durchflusszytometrie eine Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen vornehmen zu können, wurden die Zellen zusätzlich mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. PI wird von Zellen mit einer geschädigten Membran aufgenommen und interkaliert mit Nukleinsäuren, was zu einer Anfärbung dieser Zellen führt. Somit kann man frühapoptotische Zellen als Annexin V positiv und PI negativ definieren, wohingegen spätapoptotische und nekrotische Zellen Annexin V und PI positiv sind [64]. Zellen, welche nur PI positiv sind, werden ebenfalls zu den Letzteren gezählt (Abb. 6).

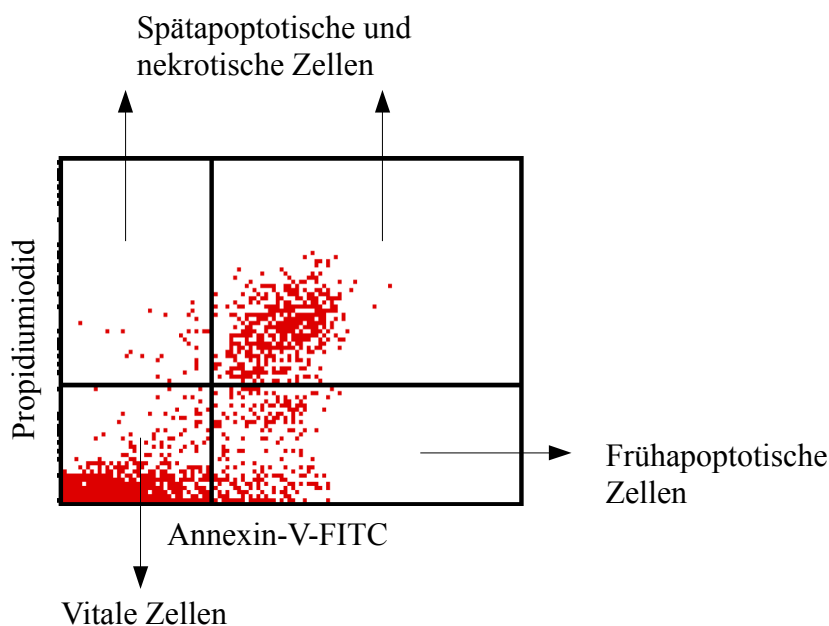


Abbildung 6: Darstellung der vitalen, nekrotischen, früh- und spätapoptotischen Zellen.
Die Anfärbung erfolgte mit Annexin V-FITC und PI

Die Zellen wurden in 100 μl Annexin-binde-Puffer aufgenommen und mit 5 μl Annexin V 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden weitere 400 μl Annexin-binde-Puffer hinzugefügt. Unmittelbar vor der Messung wurden 15 μl (20 $\mu\text{g/ml}$) PI zugesetzt. Die Zellen wurden im FSC und SSC so eingestellt, dass alle Zellen – einschließlich Zellschrott – betrachtet werden konnten.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Im Verlauf der Transfektion wurde der Einfluss der miRNA-181a auf die Expression verschiedener Proteine untersucht. Hierzu wurden die Zellen (ca. 2×10^5 bis 5×10^6 Zellen) mit PBS gewaschen und anschließend in 50 – 100 μl RIPA-Lysepuffer lysiert. Um einen Abbau bzw. eine Dephosphorylierung der Proteine zu verhindern, wurden dem Lysepuffer Phosphatase- und Protease-Inhibitoren zugesetzt. Die Proben wurden für 20 min auf Eis inkubiert und bis zur Weiterverarbeitung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Vor der Proteinbestimmung wurden die Proben, um einen vollständigen Aufschluss der Zellen zu erreichen, mit 2 x 8 Pulsen Ultraschall behandelt, abzentrifugiert (10 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$, 10000 g) und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die Bestimmung des Proteingehaltes wurde nach dem Protokoll von Bradford bestimmt

[65]. Der negativ geladene Farbstoff Coomassie-Blue-G-250 bindet an positiv geladene Aminosäurereste von Proteinen, wodurch es zu einem Farbumschlag von rotbraun (465 nm) zu blau (595 nm) kommt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist somit ein Maß für den Proteingehalt der Lösung. Durch die Verwendung von Standards mit bekannten Proteinkonzentrationen kann eine Eichkurve erstellt und der genaue Proteingehalt der Probe ermittelt werden.

Es wurden von jeder Probe mehrere Verdünnungen mit A. dest in einem Volumen von 800 µl angesetzt, mit 200 µl Bradfordreagenz gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Aus jedem Ansatz wurden drei mal 200 µl in eine 96-Lochplatte pipettiert und die Extinktion bei 595 nm gemessen. Aus dem arithmetischem Mittelwert der Dreifachbestimmung wurde, unter Berücksichtigung der Verdünnungen, mit Hilfe der Standardkurve der Proteingehalt ermittelt. Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen von 2-fach Probenpuffer und 5 % Mercaptoethanol versetzt, bei 95 °C für 10 min denaturiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

2.4.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine effiziente Methode, um ein Proteingemisch der Größe nach aufzutrennen. Durch die Verwendung von SDS im Probenpuffer wird die Ladung der Proteine maskiert, so dass die Auftrennung nur nach der Größe und nicht nach dem isoelektrischen Punkt der Proteine erfolgt. Anschließend können die Proteine mittels Comassie-Färbung, Silber-Färbung oder Western Blot sichtbar gemacht werden. So wurde die Expression verschiedener Proteine im Verlauf einer Transfektion überprüft.

Es wurden 10-20 µg Protein in einem gleichen Volumen auf ein 15 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Größenstandard mitgeführt. Nach der Auftrennung bei konstanter Spannung wurden die Proteine mittels Western Blot (2.4.3) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) - Membran übertragen und durch spezifische Antikörper nachgewiesen.

2.4.3 Western Blot

Der Western Blot stellt eine vielseitige Methode dar, um Proteine durch spezifische Antikörperreaktionen sichtbar zu machen. Hierbei erfolgt zunächst eine Übertragung der Proteine auf eine Membran. In der vorliegenden Arbeit wurde ein sogenannter Semi-Dry-Blot zur Übertragung verwendet, bei dem das Gel und die Membran in Whatmann-Papier eingebettet in einem senkrecht zum Gel verlaufenden elektrischen Feld liegen. Es wurde eine Stromstärke von 1 mA/cm² Membran für 60 min angelegt.

Nach dem Transfer wurde die Membran mit Ponceau S angefärbt, um den korrekten

Transfer zu überprüfen. Ponceau S ist ein roter Azofarbstoff, der reversibel an positiv geladene Aminogruppen bindet und somit einen gleichmäßigen Proteinauftrag, eventuelle Luftblasen und weitere Fehler im Transfer nachweisen kann, bevor mit der eigentlichen Immunreaktion einzelne Proteine detektiert werden. Um den Nachweis verschiedener Proteine unterschiedlicher Größen gleichzeitig zu ermöglichen, wurde die Membran an mehreren Stellen zerschnitten: unter 75 kDa, zwischen 50 und 37 kDa und zwischen 37 und 25 kDa. Nach dem Entfärben der Membran durch Anode II Puffer wurde die Membran für 60 min mit 5 %iger (w/v) Magermilch in TBST oder 5 % iger (w/v) BSA-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden.

Für die Immunreaktion wurde die Membran mit den in Tabelle 11 angegebenen Antikörpern für 60 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Tabelle 11: Im Western Blot verwendete Antikörper und die entsprechenden Verdünnungen.

Antikörper	Größe	Verdünnung	Wirt	Verdünnung sek. AK
pAkt Ser 473	60 kDa	1:500 in 1 % MM	Kaninchen	1:5000 in 1 % MM
Akt	60 kDa	1:1000 in 1 % MM	Kaninchen	1:5000 in 1 % MM
PTEN	54 kDa	1:1000 in 1 % BSA	Kaninchen	1:5000 in 1 % BSA
GAPDH	40 kDa	1:20000 in 1 % MM	Maus	1:20000 in 1 % MM
HMGB1	25 kDa	1:10000 in 10 % MM	Maus	1:20000 in 1 % MM

Sek. AK: sekundär-Antikörper; BSA: bovines Serumalbumin; MM: Magermilch

Nach drei Waschschritten für je fünf min mit TBST wurde die Membran für 60 min bei RT mit dem in Tabelle 11 aufgeführten sekundären Antikörper inkubiert. Die Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) ist ein Enzym, welches in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid das Phthalazin-Derivat Luminol oxidiert, was zu einer Chemilumineszenz führt. Dazu wurde die Membran 5 min mit der Substratlösung inkubiert und anschließend mit der Kodak-Imager-Station 440 detektiert.

Für die Bestimmung des Phosphorylierungsstatus von Akt wurde zunächst die phosphorylierte Form detektiert, im Anschluss erfolgt die Inkubation und Detektion des Gesamtproteins. Für die Detektion von PTEN wurde die Membran nach der Detektion von Gesamt-Akt für 15 min mit 10 ml Stripping-Puffer (BioRad) inkubiert, um vorherige Antikörperbindungen zu lösen, erneut für 60 min mit 5 % iger BSA-Lösung blockiert und anschließend mit dem PTEN-Antikörper inkubiert.

2.5 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie bietet im Vergleich zur konventionellen Lichtmikroskopie den Vorteil, dass optische Schnitte durch das zu betrachtende Objekt gelegt werden, so dass das Objekt nur innerhalb der Fokusebene betrachtet wird. Das Licht ober- bzw. unterhalb der Fokusebene wird ausgeblendet. Bei dem verwendeten Mikroskop handelte es sich um ein Laser-Scanning-Mikroskop LSM 410 der Firma Zeiss, welches zusätzlich zu den zwei internen Helium-Neon-Lasern (543 nm und 633 nm) über einen externen Argon-Laser (458 nm, 488 nm und 510 nm) verfügt. Das Versuchsobjekt wird von dem fokussierten Laser punktweise abgetastet und am Computer aus den einzelnen Punkten ein Bild zusammengesetzt. Die Detektionseinheit des LSM 410 besteht aus einem Durchlichtdetektor und zwei Auflichtfluoreszenzdetektoren (PMT), welchen zwei Emissionsfilter (Band-Pass-Filter [BP] und Lang-Pass-Filter [LP]) vorgeschaltet sind sowie variablen Lochblenden. Die Steuerung und Auswertung der Bilder erfolgte über die LSM Software Version 3.98.

Die LSM wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um eine Aufnahme der verwendeten Oligonukleotide in die Zellen nach Transfektion zu überprüfen. Hierzu wurde die Zellmembran mit dem Lipidfarbstoff PKH26 GL der Firma Sigma gefärbt, so dass die Zellmembran im Mikroskop rot erscheint, die Oligonukleotide im Inneren der Zelle jedoch grün.

Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion geerntet, zwei Mal in Medium ohne Zusätze gewaschen und in 125 µl Lösung C aufgenommen. Der Farbstoff wurde 1:125 mit Lösung C verdünnt und 125 µl zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 4 min wurde die Reaktion durch Zugabe des gleichen Volumens FKS gestoppt. Nach Zugabe von 500 µl Komplettmedium wurden die Zellen erneut gewaschen und ein neues 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgten drei weitere Waschschriffe mit PBS. Zur Bildaufnahme wurden die gefärbten Zellen in der gewünschten Zellzahl in Komplettmedium aufgenommen und auf einen Objektträger mit Zellkammern aufgetragen.

2.6 Statistik

Bei identischen Versuchen mit mindestens drei Wiederholungen wurden die Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die in der Arbeit vorliegenden Diagramme wurden mit dem Kalkulationsprogramm von OpenOffice (Version 3.1) bzw. Microsoft Excel 2007 erstellt. Ebenso wurde die Berechnung einer statistischen Signifikanz mittels zweiparametrigem t-Test mit OpenOffice Calc durchgeführt. Die Kaplan-Meier-Überlebensdiagramme sowie die Boxplots wurden mit SPSS für Windows (Version 15) erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Anreicherung hämatopoetischer Zellen

Zur relativen Bestimmung der miRNA-Expression mittels Microarray und quantitativer Real Time PCR (qPCR) wurden als Kontrolle hämatopoetische Stammzellen (HSZ) aus Knochenmark von Probanden, welche keine Knochenmarkserkrankung aufwiesen, angereichert. Es wurden insgesamt zehn Proben bearbeitet. In Tabelle 12 sind die Daten zu den Proben aufgeführt. Pool I und Pool II wurden als Kontrollen (Calibrator) bei der Bestimmung der miRNA-Expression mittels qPCR verwendet. Pool III wurde bei der Bestimmung der miRNA-Expression mittels Microarrays verwendet.

Tabelle 12: Zusammenfassung der HSZ-Anreicherungen.

Proben-Nr.	Zellzahl (vM)	Zellzahl (nM)	CD34+/CD45+ vM [%]	CD34+/CD45+ nM [%]	Pool
07001	$3,6 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^6$	5,24	80,74	I +II
07008	$6,8 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^5$	12,01	87,93	I
07009	$1,1 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^5$	5,65	92,05	I
07014	$9,0 \cdot 10^7$	$8,0 \cdot 10^4$	15,09	97,22	I +II
07015	$7,4 \cdot 10^7$	$9,7 \cdot 10^5$	5,23	76,33	I +II
07019	$2,8 \cdot 10^7$	$5,7 \cdot 10^5$	9,70	53,18	II
07026	$1,3 \cdot 10^7$	$5,8 \cdot 10^5$	7,92	88,79	II
08014	$5,3 \cdot 10^7$	$6,4 \cdot 10^5$	7,41	92,59	III
08030	$2,8 \cdot 10^7$	$7,4 \cdot 10^5$	6,89	90,66	III
08033	$5,9 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^6$	4,33	96,72	III
MW				71,35	

Die angegebenen Reinheiten beziehen sich auf die Lymphozyten-Population. vM: vor Anreicherung; nM: nach Anreicherung; MW: Mittelwert.

Um die miRNA-Expression weiterer Zellpopulationen zu bestimmen, wurden B-Zellen (CD19+), Monozyten (CD14+) und Granulozyten aus dem peripheren Blut freiwilliger, gesunder Probanden isoliert.

Für die Monozyten-Anreicherung wurde das Blut der sechs Probanden zu gleichen Anteilen gepoolt. Die isolierten Monozyten erreichten eine Reinheit von 94,0 % (gepoolte Probe).

Für die Anreicherung von B-Zellen wurde das Blut von fünf Probanden gepoolt. Es wurde eine Reinheit der gepoolten Probe von 82,33 % erreicht. Diese Probe wurde für die Bestimmung der miRNA-Expression mittels qPCR verwendet. Zur Bestimmung der Expression mittels Microarrays wurde von drei Probanden getrennt eine Anreicherung auf CD19 vorgenommen und eine mittlere Reinheit von 98,9 % (98,3 % - 99,7 %) erzielt.

3.2 Bestimmung der miRNA-Expression mittels Microarrays

Es ist bekannt, dass bestimmte Translokationen zu einem definiert veränderten mRNA-Expressionsprofil führen, so z.B. MLL-Aberrationen in ALLs [59]. Um ein miRNA-Expressionsprofil hämatopoetischer Zellen mit einer Translokation t(4;11)(q21q23) zu erstellen, wurde die Expression in gesunden hämatopoetischen Stammzellen, in gesunden B-Zellen sowie in den Zelllinien SEM, RS4;11 und MV4;11 mittels Microarrays ermittelt. Die drei verwendeten Zelllinien weisen neben anderen die oben erwähnte Translokation auf, die zu einem Fusionsprotein aus der Methyltransferase MLL und dem Protoonkogen AF4 führt. SEM und RS4;11 sind pro-B-ALL Zelllinien, MV4;11 ist eine monozytäre AML-Zelllinie.

Es wurden insgesamt 53 miRNAs identifiziert, die eine signifikant unterschiedliche Expression in einer Population gegenüber der Gesamtheit der Proben (common reference) aufweist. Die Heat Map (Abb. 7) zeigt die Gruppierung dieser 53 miRNAs nach zweiseitigem, hierarchischem Cluster. Jede Zeile stellt eine miRNA dar, jede Spalte die Messwerte eines Microarray-Slides. Die Gruppierung wurde anhand der Differenz der beiden Kanäle ($\log_2(\text{Hy5}/\text{Hy3})$) vorgenommen, welche bei einem zweiseitigen t-Test eine signifikante Veränderung aufwiesen ($p < 3,95 \times 10^{-5}$). Die genauen Expressionswerte und p-Werte dieser 53 miRNAs sind auf der beiliegenden CD zusammengestellt.

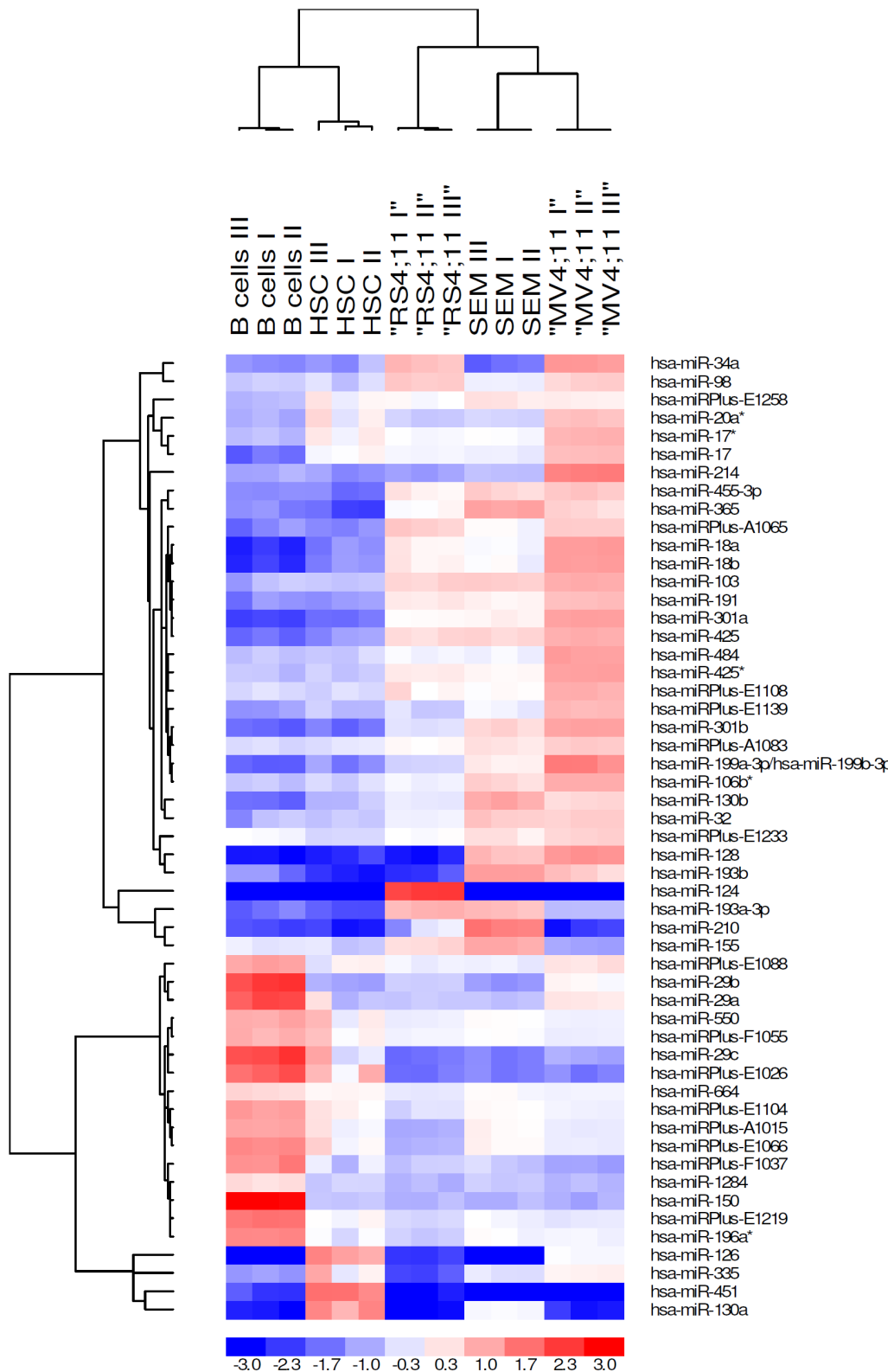


Abbildung 7: Heat Map der miRNA-Expression verschiedener hämatopoetischer Zellen.

Dargestellt sind die mittleren Expressionsratios. Rot bedeutet eine höhere Expression, blau eine niedrigere Expression als in der Gesamtheit der Proben. HSC: Hämatopoetische Stammzellen; Zelllinien: RS4;11 (pro-B-ALL), SEM (pro-B-ALL), MV4;11 (AML M5).

Von diesen miRNAs wurden 20 für eine genauere Analyse ausgewählt (Tabelle 13, angegeben ist die mittlere Expression im Vergleich zur common reference). Hierbei wurde nicht auf die größtmögliche errechnete Signifikanz geachtet, sondern auf möglichst große Unterschiede in den logarithmischen Quotienten der beiden Kanäle, da dies eine bessere Aussage über die Expression zulässt. Es wurden für jede Zellpopulation die miRNAs mit der stärksten Expression ausgewählt.

Tabelle 13: MiRNAs, welche für eine detaillierte Analyse ausgewählt wurden.

miR	Genort	Sequenz	Mittlere Expression				
			CD34+	CD19+	RS4;11	SEM	MV4;11
451	Chr. 17	AAACCGUUACCAUUACUGAGUU	1,58	-2,24	-2,94	-3,34	-3,39
126	Chr. 9	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	1,18	-3,51	-2,33	-4,41	-0,07
130a	Chr. 11	CAGUGCAAUGUUAAAAGGGCAU	1,24	-2,79	-3,23	-0,08	-2,61
29a	Chr. 7	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	-0,41	2,07	-0,65	-0,72	0,29
29b	Chr. 7	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	-1,04	2,28	-0,57	-1,22	0,04
29c	Chr. 1	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	-0,6	2,2	-1,67	-1,49	-1,02
150	Chr. 19	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	-0,66	3,03	-0,88	-0,9	-0,97
365	Chr. 16 + 17	UAAUGCCCCUAAAAUCCUUUAU	-2,07	-1,37	0,01	1,08	0,46
18a	Chr. 13	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG	-1,38	-2,54	0,18	-0,09	1,18
18b	Chr. X	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGUUAG	-1,32	-0,72	0,21	-0,07	1,16
103	Chr. 5 + 20	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	-0,67	-0,85	0,51	0,58	0,98
191	Chr. 3	CAACGGAAUCCAAAAGCAGCUG	-1,2	-1,38	0,27	0,14	0,77
193a-3p	Chr. 17	AACUGGCCUACAAAGUCCCAGU	-2,02	-1,67	0,89	0,77	-0,79
155	Chr. 21	UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU	-0,54	-0,27	0,44	1,01	-1,09
34a	Chr. 1	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	-1,17	-1,34	0,76	-1,72	3,59
98	Chr. X	UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU	-0,5	-0,6	0,63	-0,19	0,55
128	Chr. 2 + 3	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	-2,44	-2,87	-2,73	0,75	1,26
210	Chr. 11	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	-2,57	-2,14	-0,64	1,54	-2,47
124	Chr. 8 + 20	UAAGGCACGCGGUGAAUGCC	-4,26	-3,61	2,28	-4,22	-4,46
214	Chr. 1	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	-1,26	-1,01	-1,13	-0,76	1,51

Die mittlere Expression ist der Mittelwert der Expressionsratios. Rot bedeutet eine höhere Expression, blau eine niedrigere Expression als in der Gesamtheit der Proben.

Als Ergebnis zeigt sich, dass drei miRNAs stark in Stammzellen exprimiert werden (miRs 451, 126, 130a), vier zeigen eine starke Expression lediglich in reifen B-Zellen (miRs 29abc, 150). Fünf miRNAs werden von allen Zelllinien stärker exprimiert als von den gesunden Zellen (miRs 365, 18ab, 103, 191). Die miRs 193a-3p und 155 werden von SEM und RS4;11

deutlich stärker exprimiert, die miRs 34a und 98 zeigen eine stärkere Expression in RS4;11 und MV4;11 als in den anderen Proben. Die miR-128 wird nur von SEM und MV4;11 exprimiert. Die miR-210 zeigt nur in SEM eine starke Expression, die miR-124 nur in RS4;11 und die miR-214 nur in MV4;11.

Die vorhergesagten potenziellen Ziel-mRNAs dieser miRNAs wurden mittels Vergleich von zwei Datenbanken [targetscan (www.targetscan.com) [66-67], und microCOSM (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>) [68-70] ermittelt. Für die weitere Betrachtung wurden nur die Zielgene berücksichtigt, die in beiden Datenbanken aufgeführt waren. Aufgrund der großen Datenmenge sind die Ergebnisse dieser Analyse lediglich im Anhang dargestellt (siehe beiliegende CD). Es wurden zwischen einem und 190 gemeinsamen Zielgenen identifiziert. Die miRNAs 18a und 18b sowie 29a, 29b und 29c werden aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zu je einer Familie zusammengefasst und wurden in der vorliegenden Arbeit gemeinsam betrachtet. Ebenso wurden bei der Analyse der miRNA 34a auch die miRNAs 34b-5p, 34c, 34c-5p, 449abc und 699 mit betrachtet und bei der miR-98 die let-7-Familie, da sie eine hohe Sequenzhomologie aufweisen.

3.3 Etablierung einer quantitativen PCR zur Bestimmung von miRNAs

Parallel zu der Bestimmung der miRNA-Expression mittels Microarrays wurde die Expression von zwei spezifischen microRNAs durch eine quantitative Real-Time PCR bestimmt. Hierzu wurden die miR-142 und miR-181a ausgewählt, da für beide bereits eine mögliche Rolle in der Hämatopoese und/oder Leukämiegenese beschrieben wurde (1.1.3 und 1.1.4).

Es konnte eine quantitative Real-Time PCR für die reifen miRNAs der miR-142 und miR-181a unter Verwendung von TaqMan[®]-Sonden etabliert werden. Als endogene Kontrolle wurde die small nucleolar RNA, C/D box 48 (RNU48) verwendet.

Um die Effizienz der drei verschiedenen PCR-Reaktionen zu bestimmen, wurde eine PCR mit fünf unterschiedlichen Konzentrationen cDNA (über fünf logarithmische Stufen) durchgeführt und die Ct-Werte (Threshold Cycle) gegenüber der RNA-Konzentration (als Log-Wert) aufgetragen. Die Effizienz E kann aus einer solchen Auftragung mit der Formel $E = 10^{[-1/\text{Steigung}]}$ berechnet werden. In Tabelle 14 sind die so ermittelten Werte zusammengefasst.

Tabelle 14: Berechnung der PCR-Effizienz.

	Steigung	Effizienz
miR-142-3p	-3,08	2,11
miR-181a	-3,13	2,09
RNU48	-3,33	2,00

Die Effizienzen der verschiedenen PCR-Reaktionen weichen voneinander ab, was eine

Vergleichbarkeit der PCRs erschwert. Aus diesem Grund wurde für die statistische Auswertung die REST-Methode verwendet. Diese bietet die Möglichkeit, unter Berücksichtigung der jeweiligen PCR-Effizienzen, die RNA-Expression in Relation zu einer Kontrolle (Calibrator) zu setzen. Als Calibrator wurde die RNA aus gesunden HSZ bzw. in den Transfektionsversuchen die Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt verwendet.

In ersten Versuchen wurde die miRNA-Expression von verschiedenen leukämischen Zelllinien untersucht, um die Spezifität sowie die Reproduzierbarkeit der PCR zu überprüfen (Abb. 8).

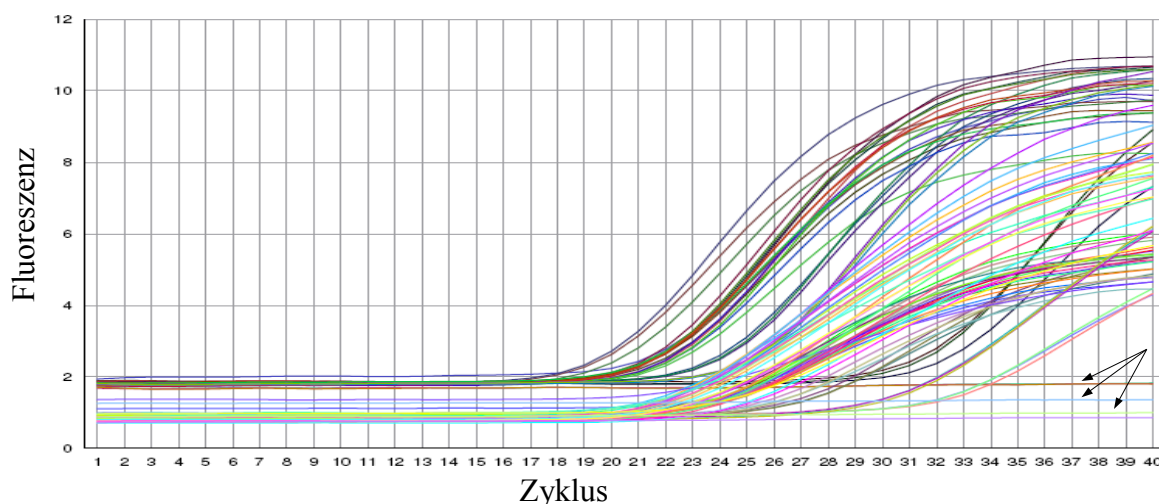


Abbildung 8: Zunahme der Fluoreszenz während der PCR.

Bestimmt wurde die Expression der miRs 142, 181a und RNU48 in den verwendeten Zelllinien. Die Pfeile markieren die Proben ohne reverse Transkription.

Keine der Proben ohne Reverse Transkription zeigt eine Zunahme in der Fluoreszenz, weshalb davon auszugehen ist, dass die verwendeten Primer und Sonden-Paare hochspezifisch sind und nur die cDNA der reifen miRNAs detektieren.

Ein Vergleich der Ct-Werte von zwei unabhängigen Versuchen (Abb. 9) zeigt eine gute Korrelation ($R^2=0,85$).

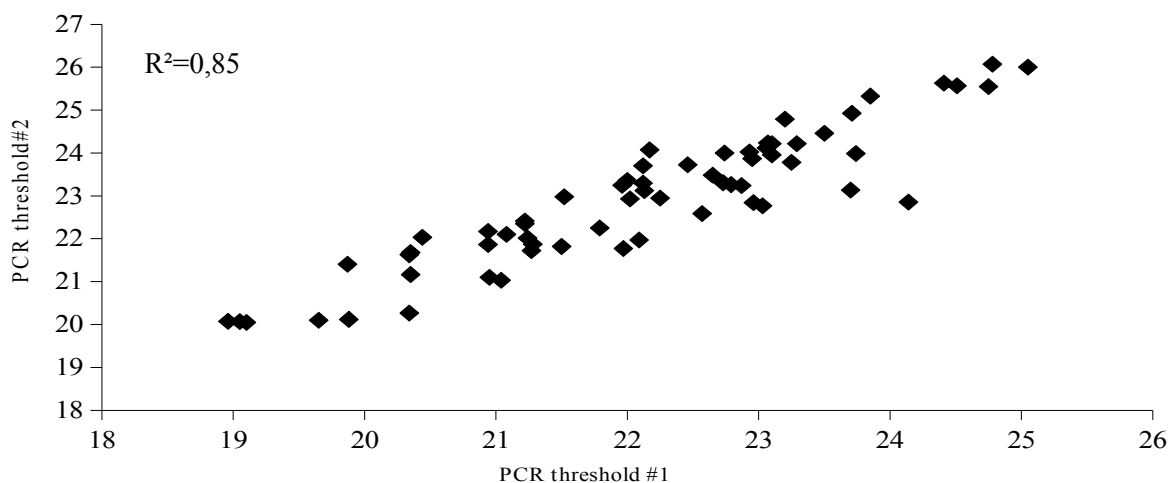


Abbildung 9: Vergleich der Ct-Werte von zwei unabhängigen PCR-Versuchen.

Bestimmt wurde die Expression der miRs 142, 181 und RNU48 in den verwendeten Zelllinien.

3.4 Expression der miR-142 und miR-181a in Zelllinien und hämatopoetischen Subpopulationen

Die Expression der miR-142 und der miR-181a wurde in elf Zelllinien (acht ALL/Burkitt-Lymphom (hgNHL) und drei AML) sowie gesunden HSZ, B-Zellen, Monozyten und Granulozyten untersucht. Detaillierte Angaben zu den Zelllinien (Diagnose, Subtyp, und Zytogenetik) sind im Anhang 9.2 zusammengestellt.

Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt, bei jedem erfolgte eine Dreifachbestimmung der miRNA-Expression.

3.4.1 Bestimmung der miR-142-Expression mittels qPCR

In Abbildung 10 sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der relativen Expression dargestellt. Eine Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Im Anhang 9.2 sind die mittels REST-Methode errechneten Mittelwerte der drei PCRs sowie die p-Werte angegeben.

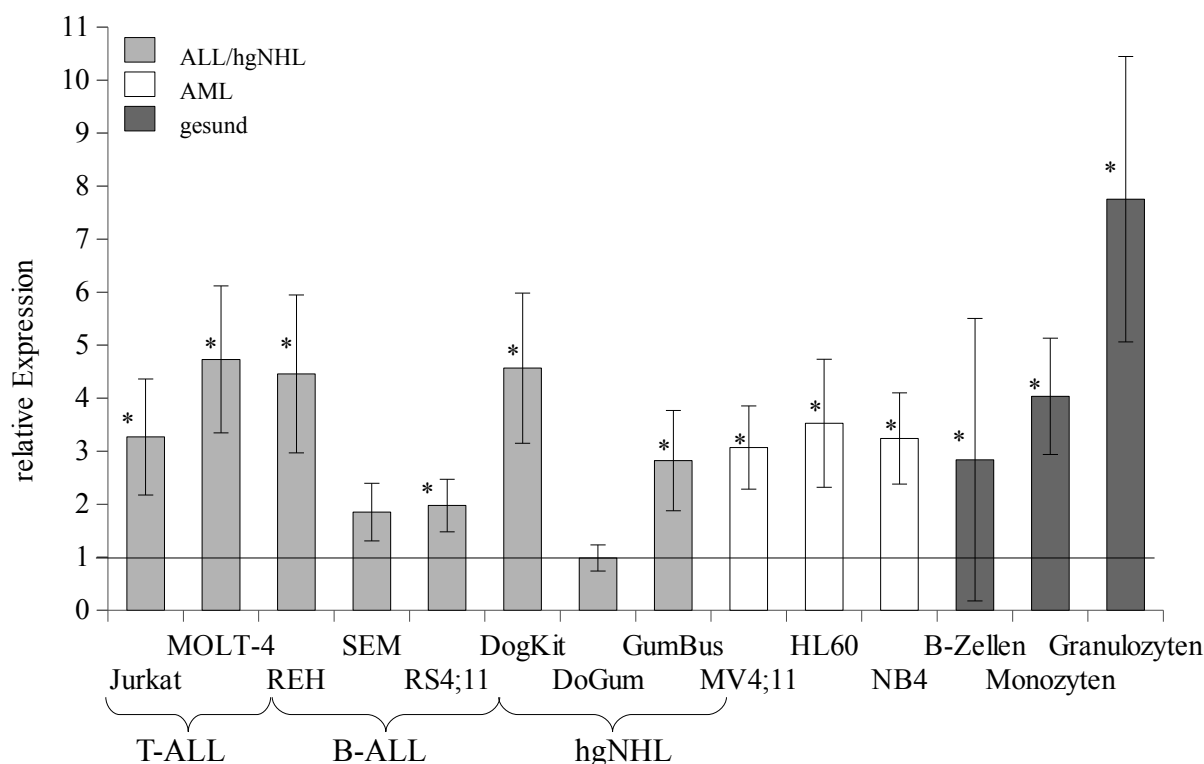


Abbildung 10: Expression der miR-142 in Zelllinien und gesunden Zellen.

Dargestellt ist die relative Expression im Vergleich zu gesunden HSZ. Ein Wert über 1 bedeutet eine höhere Expression, ein Wert unter 1 eine niedrigere Expression als CD34+ Zellen. Signifikante Veränderungen ($p \leq 0,05$) sind mit einem Stern gekennzeichnet.

In allen untersuchten Zellen konnte eine Expression der miR-142 festgestellt werden. Die gesunden, reifen Zellen weisen eine signifikant höhere Expression als HSZ auf, am stärksten ist die Expression in Granulozyten. Die zwei T-ALL-Zelllinien sowie die drei B-ALL-Zelllinien weisen ebenfalls eine höhere Expression auf. DoGum zeigt als einzige Zelllinie eine Expression auf Stammzellniveau, während die beiden anderen hgNHL-Zelllinien auch eine signifikant höhere Expression zeigen. Die drei AML Zelllinien exprimieren die miR-142 ebenfalls auf einem signifikant höheren Level als HSZ. Keine Probe zeigt eine niedrigere Expression als Stammzellen.

Die Ergebnisse der Microarray-Analyse ergaben ein etwas anderes Expressionsprofil: nur die gesunden B-Zellen zeigen eine deutlich höhere Expression als die common reference. Die anderen Zellpopulationen weisen eine Expression um 0 auf (Tabelle 15). Es konnten somit weder zwischen den Zelllinien und HSZ noch zwischen den einzelnen Zelllinien Unterschiede in der miRNA Expression beobachtet werden.

Tabelle 15: Expressionsprofil der miR-142 mittels Microarrays.

	HSZ	B-Zellen	RS4;11	SEM	MV4;11
rel. Expression	0,08	0,94	-0,08	0,13	0,13

3.4.2 Bestimmung der miR-181a-Expression mittels qPCR

Die miR-181a konnte ebenfalls in allen untersuchten Zellen detektiert werden (Abb. 11). Im Anhang (9.2) sind die mittels REST-Methode errechneten Mittelwerte der drei PCRs sowie die p-Werte angegeben.

Alle drei reifen Zellpopulationen weisen eine signifikant niedrigere Expression als HSZ

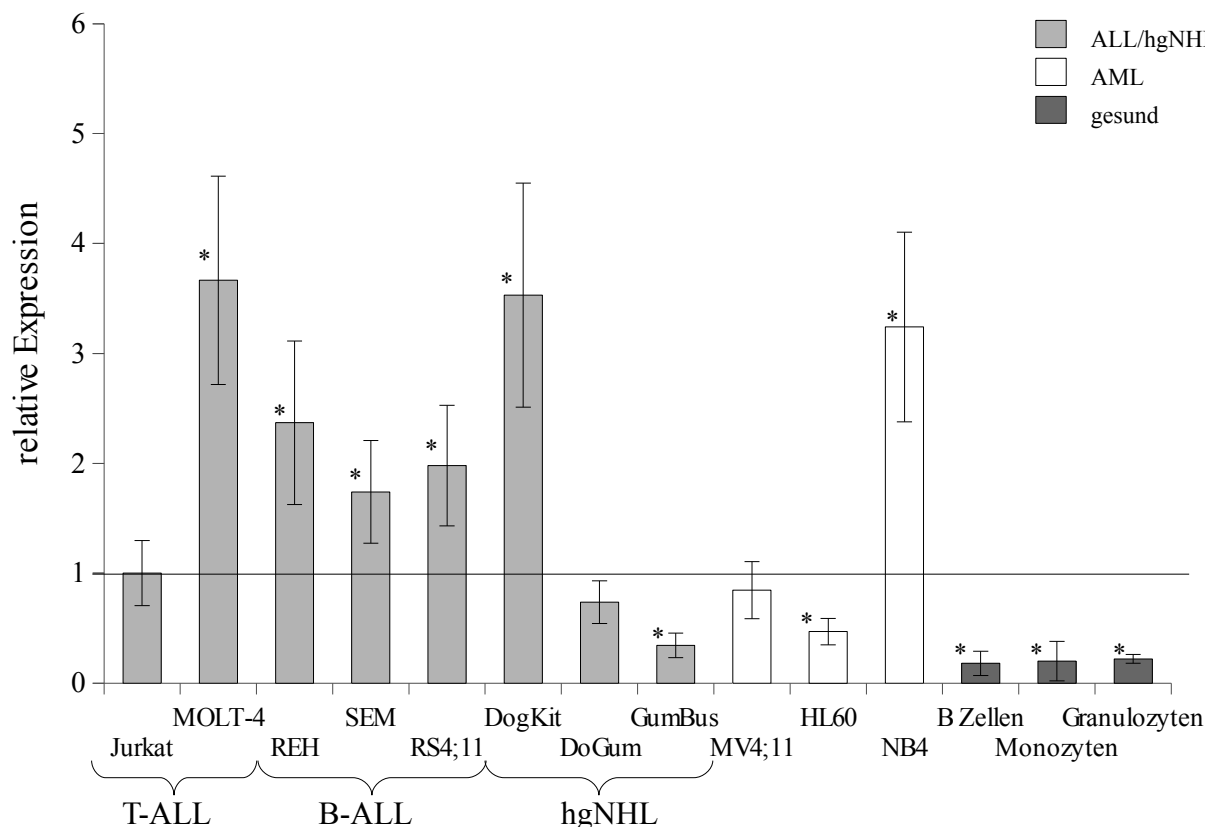


Abbildung 11: Expression der miR-181a in Zelllinien und gesunden Zellen.

Dargestellt ist die relative Expression im Vergleich zu gesunden HSZ. Ein Wert über 1 bedeutet eine höhere Expression, ein Wert unter 1 eine niedrigere Expression als CD34+ Zellen. Signifikante Veränderungen ($p \leq 0,05$) sind mit einem Stern gekennzeichnet.

auf, wobei die Unterschiede zwischen den Populationen nur gering sind. Die beiden T-ALL-Zelllinien zeigen ein uneinheitliches Bild: während Jurkat eine Expression auf Stammzellniveau zeigt, weist MOLT-4 die stärkste Expression aller untersuchten Proben auf. Die drei B-ALLs zeigen einheitlich eine signifikant höhere Expression als HSZ. Die hgNHL-Zelllinie DogKit zeigt ebenfalls eine sehr starke Expression, wohingegen DoGum eine leicht niedrigere und GumBus eine stark verringerte Expression im Vergleich zu HSZ aufweisen. Bei den AML-Zelllinien zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den hgNHL-Zelllinien: MV4;11 hat eine leicht, HL60 eine stark reduzierte und NB4 eine stark erhöhte Expression im Vergleich zu HSZ.

Auch hier zeigen die Microarrays ein unterschiedliches Expressionsmuster: B-Zellen zeigen wie in der PCR gegenüber HSZ eine stark reduzierte Expression. Die Zelllinien weisen eine leicht stärkere (RS4;11, MV4;11) bzw. leicht schwächere Expression (SEM) als HSZ auf, die sich am geringsten von der common reference in ihrer Expression unterscheiden (Tabelle 16).

Keiner dieser Unterschiede erreichte das Signifikanzniveau.

Tabelle 16: Expressionsprofil der miR-181a mittels Microarrays.

	HSZ	B-Zellen	RS4;11	SEM	MV4;11
rel. Expression	0,22	-2,42	0,62	-0,64	0,66

3.5 Bestimmung der miRNA-Expression in *de novo* Zellen

Es wurden von 57 Patienten mit AML bzw. ALL die MCs mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Für die Analyse wurden nur Proben mit einem Blastenanteil von über 60 % weiter aufgearbeitet. Die detaillierten Daten der 29 AML und acht ALL Patienten sind im Anhang 9.3 aufgeführt, ebenso wie die Expressions- und p-Werte. 26 der AML und fünf ALL Proben wurden bei initialer Diagnosestellung entnommen. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung betrug 65 Jahre für AML- und 51 Jahre für ALL-Patienten. 17 der AML-Patienten sowie sechs ALL-Patienten erhielten eine potenziell kurative, intensive Chemotherapie (neun AML bzw. null ALL davon unter anderem mit einer allogenen Stammzell-Transplantation). Die morphologischen und zytochemischen Untersuchungen der AML Proben ergab folgende Einteilung nach FAB-Klassifikation: zwei M0, sieben M1, sieben M2, eine M3, vier M4, zwei M5, eine M7; bei fünf Patienten konnte der Subtyp nicht eindeutig klassifiziert werden. Die ALL-Proben teilten sich wie folgt auf: eine pro-B-ALL, vier c-ALL und eine kortikale T-ALL. Außerdem wurden zwei kutane T-Zell-Lymphome (Sézary-Syndrom) analysiert. Bei 19 der AML-Patienten wurden molekularbiologische Untersuchungen zu Mutationen im FLT3 bzw. NPM1 Gen durchgeführt. Hierbei wurden bei sieben (FLT3) bzw. neun (NPM1) Patienten Mutationen mittels Sequenzierung nachgewiesen.

Die Bestimmung der miRNA-Expression erfolgte analog zu den Zelllinien und es wurde die relative Expression bezogen auf gesunde HSZ errechnet. In Abb. 12 und 13 sind die Expression der miR-142 und der miR-181a grafisch dargestellt.

Die miR-142 (Abb. 12) konnte in allen Proben detektiert werden. Die Expression ist bei der Mehrheit der Patienten höher als in gesunden HSZ. Vier der AML-Proben zeigen eine niedrigere Expression als HSZ, in drei Fällen ist sie nicht signifikant niedriger. Eine Probe weist eine signifikant niedrigere Expression auf. Die miRNA-Expression ist in 13 Patienten signifikant erhöht, zwölf Proben zeigen einen nicht signifikant höheren Wert. Die Probe mit dem höchsten Wert (Probe 12, 10,4-fache Expression im Vergleich zu gesunden HSZ) hebt sich deutlich von den anderen ab, es konnten jedoch keine Besonderheiten in den klinischen oder molekularbiologischen Parametern im Vergleich zu den anderen Proben identifiziert werden. Bei den ALL-Patienten zeigt ebenfalls ein Patient eine (nicht signifikante) niedrigere Expression, zwei zeigen eine nicht signifikante Erhöhung und fünf Proben sind in der miRNA-Expression zum Teil deutlich erhöht. Die beiden Proben mit den höchsten Werten (Probe 32 und 35; 9,6 bzw. 11,2 fache Überexpression) sind von Patienten mit einem Sézary-Syndrom (kutanes T-Zell Lymphom). Der dritthöchste Wert (Probe 31, 4,59-fache Expression) stammt von einer kortikalen T-ALL, die anderen Proben stammen von Patienten mit einer B-ALL.

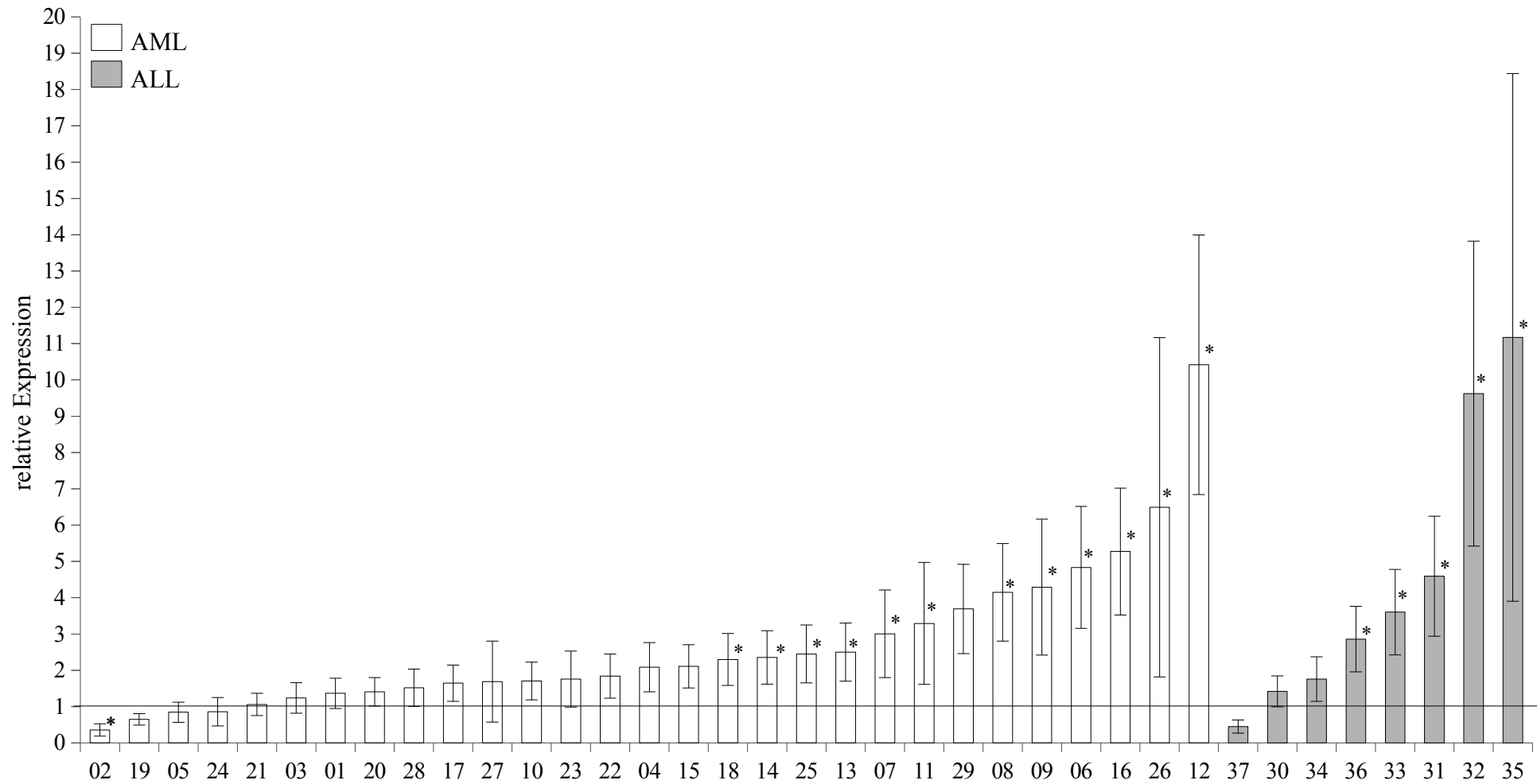


Abbildung 12: Expression der miR-142 in de novo Material.

Dargestellt ist die relative Expression im Vergleich zu gesunden HSZ. Ein Wert über 1 bedeutet eine höhere Expression, ein Wert unter 1 eine niedrigere Expression als CD34+ Zellen. Eine signifikante Veränderung ($p \leq 0,05$) wurde mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Expression der miR-181a (Abb. 13) konnte ebenfalls in allen Proben bestimmt werden. Generell zeigt sich ein etwas anderes Expressionsmuster als bei der miR-142. So zeigen acht AML-Patienten eine geringere Expression als gesunde HSZ, die bei sechs signifikant ist (bis zu 5,6-fach reduziert). Vier AML-Patienten zeigen eine Expression auf dem Niveau der Stammzellen, und weitere fünf eine nicht signifikante Erhöhung. Bei zwölf AML-Patienten ist die Expression signifikant erhöht. Probe 15 hebt sich mit einer 13,6-fachen Überexpression deutlich von den anderen Werten ab. Sie stammt von dem einzigen Patienten mit einer Promyelozytenleukämie (FAB M3, t(15;17)). Bei den ALL-Patienten zeigen zwei eine signifikant niedrigere Expression. Fünf Proben weisen eine signifikante Erhöhung der Expression auf, eine Probe zeigt eine Expression auf Stammzellniveau. Es zeigt sich jedoch keine Aufteilung nach B- oder T-ALL wie bei der miR-142 beobachtet.

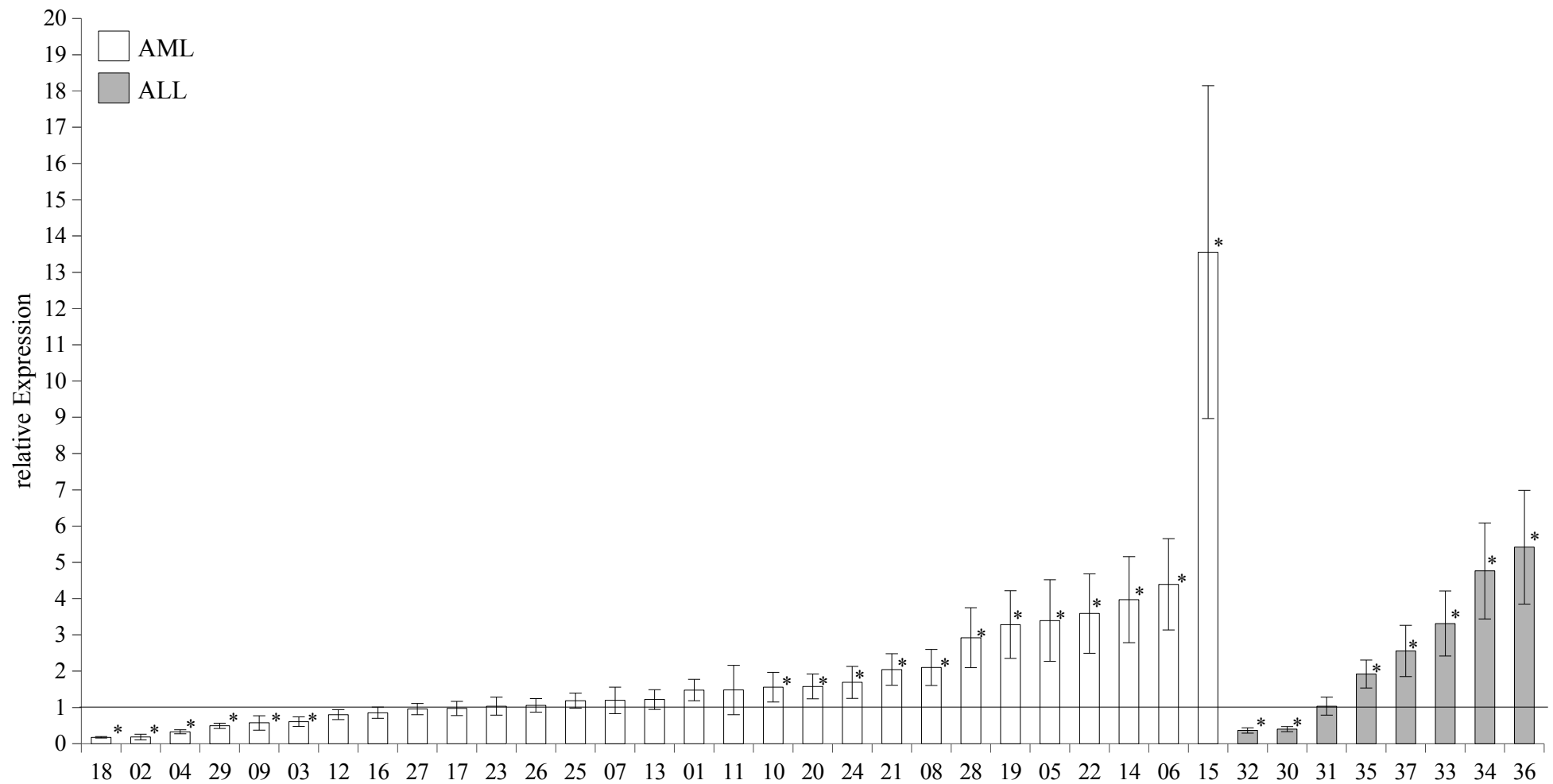


Abbildung 13: Expression der miR-181a in de novo Material.

Dargestellt ist die relative Expression im Vergleich zu gesunden HSZ. Ein Wert über 1 bedeutet eine höhere Expression, ein Wert unter 1 eine niedrigere Expression als CD34+ Zellen. Eine signifikante Veränderung ($p \leq 0,05$) wurde mit einem Stern gekennzeichnet.

3.5.1 Prognostische Bedeutung der microRNA-Expression

Um eine mögliche prognostische Bedeutung der miRNA-Expression zu ermitteln, wurden Kaplan-Meier-Überlebensdiagramme erstellt, wobei die Höhe der miRNA-Expression als Diskriminator verwendet wurde. Aufgrund der Fallzahlen wurden diese Analysen nur an den AML- Proben durchgeführt.

Für eine bessere Vergleichbarkeit der Proben wurden die Patienten, welche mit einem palliativen Therapiekonzept behandelt wurden, sowie Rezidivproben ausgeschlossen, so dass nur die Patienten mit einer Probe zum Zeitpunkt der initialen Diagnosestellung und einer kurativen Therapie berücksichtigt wurden. Bei einem Diskriminator von eins, was der Expression in HSZ entspricht, konnten keine signifikanten Unterschiede in der Überlebenszeit ermittelt werden, ebenso wenig wie bei der Einteilung in Quartile. Die Festlegung des Diskriminators auf das 0,5-fache Niveau der Stammzellexpression zeigt bei der miR-181a einen nicht signifikanten Trend zu einem besseren Überleben bei geringer miRNA-Expression (Abb. 14). Zu beachten ist, dass die Gruppen sehr ungleichmäßig verteilt sind, da nur vier Patienten eine sehr niedrige miR-181a Expression aufweisen. Die geringe Fallzahl von 15 Patienten schränkt die Aussagekraft der Analyse ein.

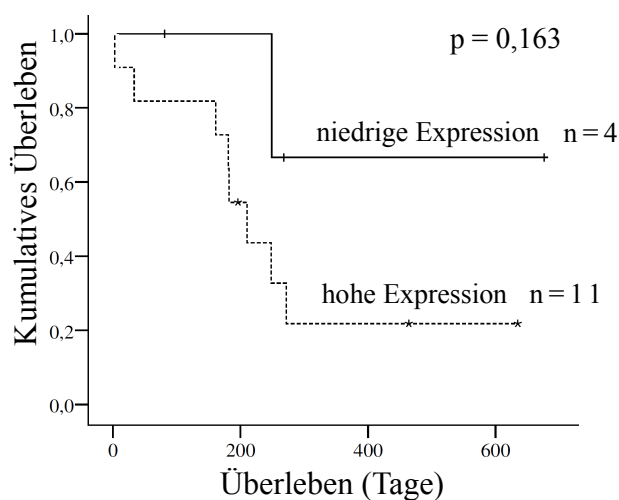


Abbildung 14: Überlebensdiagramm für die Expression der miR-181a.

Dargestellt ist das kumulative Gesamtüberleben der AML-Patienten im Vergleich zwischen miR-181a Expression $\leq 0,5$ -fach HSZ vs. miR-181a Expression $> 0,5$ -fach HSZ

Um die Kohorte weiter zu vereinheitlichen erfolgte eine zytogenetische Klassifikation der Patienten anhand der Richtlinien der MRC-AML-10-Studie [44], s.a. 1.2.1. Vier Patienten fielen aufgrund ihrer Aberration in die ungünstige Risikogruppe, 21 Patienten wiesen einen Karyotyp mit intermediärem Risiko auf. Ein Patient hatte eine Aberration mit günstiger Prognose. Aufgrund der Fallzahlen wurden nur die Patienten mit intermediärem Risiko weiter betrachtet.

Die Gruppe der Patienten mit intermediärem zytogenetischem Risiko, initialer Diagnose und kurativem Therapiekonzept (n=14) wurde nach der miR142-Expression in zwei gleichgroße Quantile unterteilt. Die Teilung erfolgte bei einer Expression von 1,68 (im Vergleich zu HSZ), dies entspricht dem Median (Tabelle 17).

Tabelle 17: miR-142 Expression und Überlebenszeit der Patienten mit intermediärem zytogenetischem Risiko.

Expression kleiner als Median			Expression größer als Median		
Patienten - Nummer	miRNA - Expression	Überlebens-Zeitraum (Tage)	Patienten - Nummer	miRNA - Expression	Überlebens-Zeitraum (Tage)
02	0,36	249 †	10	1,71	464
05	0,85	272 †	04	2,09	676
24	0,86	196	18	2,30	268
21	1,06	161 †	14	2,35	635
03	1,24	210 †	07	3,01	182 †
01	1,37	6 †	29	3,69	81
17	1,65	181 †	12	10,42	248 †

†: verstorben

Die anschließende Überlebensanalyse ergab ein signifikant besseres Überleben für Patienten mit einer hohen miR-142 Expression ($p = 0,032$, Abb. 15). In der Gruppe mit geringer miRNA-Expression waren bei Abschluss der Analyse sechs Patienten verstorben, bei hoher miRNA-Expression zwei. Dies ist der erste Hinweis für eine mögliche prognostische Bedeutung der miR-142 bei AML-Patienten.

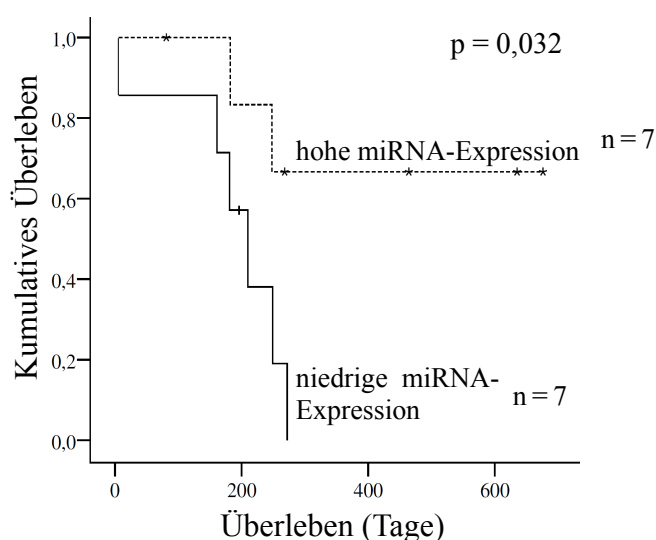


Abbildung 15: Überlebensdiagramm für die miR-142.

Dargestellt ist das kumulative Gesamtüberleben der AML-Patienten bei initialer Diagnosestellung, potentiell kurativer Therapie und intermediärem zytogenetischem Risiko.

3.5.2 Zusammenhang der miRNA-Expression mit weiteren diagnostischen Faktoren

Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten einen Zusammenhang der Expression unterschiedlicher miRNAs mit diagnostischen Faktoren wie dem morphologischen Subtyp, einer vorherigen Erkrankung am MDS sowie dem Mutationsstatus des NPM1-Gens [41, 71, 98]. Die hier vorgestellten Expressionsdaten wurden ebenfalls auf diese Zusammenhänge hin untersucht.

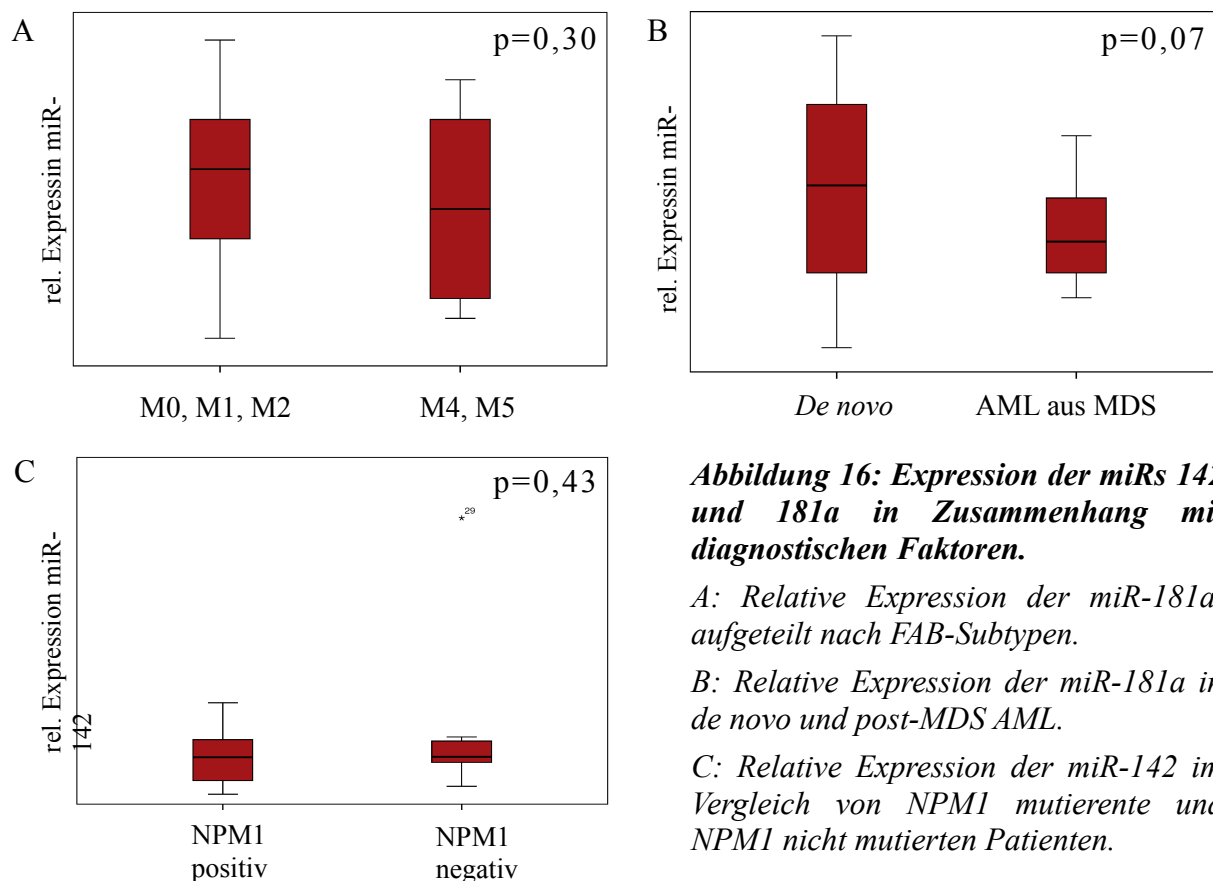


Abbildung 16: Expression der miRs 142 und 181a in Zusammenhang mit diagnostischen Faktoren.

A: Relative Expression der miR-181a, aufgeteilt nach FAB-Subtypen.

B: Relative Expression der miR-181a in de novo und post-MDS AML.

C: Relative Expression der miR-142 im Vergleich von NPM1 mutierende und NPM1 nicht mutierten Patienten.

Debernardi *et. al* zeigten 2007 in einer Gruppe von 30 AML-Patienten mit normalem Karyotyp eine höhere miR-181a Expression in unreifen FAB-Subtypen im Vergleich zu reiferen Subtypen. In Abbildung 16 A ist die relative Expression der miR-181a nach Subtypen aufgeteilt dargestellt. Es konnte kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen beobachtet werden.

Garzon *et al.* beschrieben eine unterschiedliche Expression der miR-181a im Zusammenhang mit einer Entwicklung der AML aus einem MDS [98]. Von den in dieser Arbeit untersuchen 29 Patienten entwickelten sechs (21 %) die AML nach einer vorherigen MDS Erkrankung. Abbildung 16 B zeigt die Expression der miR-181a aufgeteilt nach Entstehung der AML. Hier konnte eine geringere Expression in der Gruppe mit vorhergehender MDS im Vergleich zu *de novo* AML beobachtet werden (p=0,07).

Eine zweite Studie von Garzon *et al.* aus dem Jahr 2008 untersuchte die Expression verschiedener miRNAs in Zusammenhang mit dem Auftreten von Mutationen im NPM1-Gen [98]. Hier zeigte die miR-142 eine höhere Expression bei Vorliegen der Mutation im Vergleich zu nicht-mutierten Proben. Eine NPM1-Mutationsanalyse wurde bei 19 der hier untersuchten Patienten durchgeführt, neun ergaben ein positives Ergebnis (47 %). Es konnte jedoch kein Unterschied in der miR-142 Expression zwischen den beiden Gruppen beobachtet werden (Abb. 16 C).

3.6 Hemmung der miR-181a in Zellen der akuten Leukämie

3.6.1 Etablierung einer miRNA-Inhibition in ALL-Zellen.

Für funktionelle Untersuchungen wurde unter Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden eine Hemmung der miR-181a angestrebt. In einem ersten Versuch wurden drei unterschiedliche Konzentrationen verwendet, um die größtmögliche Hemmung zu ermitteln, ausgehend von den in der Arbeitsgruppe etablierten Bedingungen zur Transfektion von siRNAs mit 25µg Oligonukleotid. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der qPCR zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion dargestellt. Deutlich zu sehen ist die Reduktion der Expression bei den mit dem spezifischen Oligonukleotid transfizierten Zellen. Es wurden keine großen Unterschiede in der Hemmung zwischen den einzelnen Konzentrationen festgestellt, so dass die weiteren Versuche mit einer Gesamtmenge von 12,5 µg Oligonukleotid bzw. der entsprechenden Menge Wasser durchgeführt wurden. Aufgrund von Hinweisen aus der Literatur wurde der Beobachtungszeitraum über eine Zeitspanne von 15 – 72 Stunden festgelegt [40].

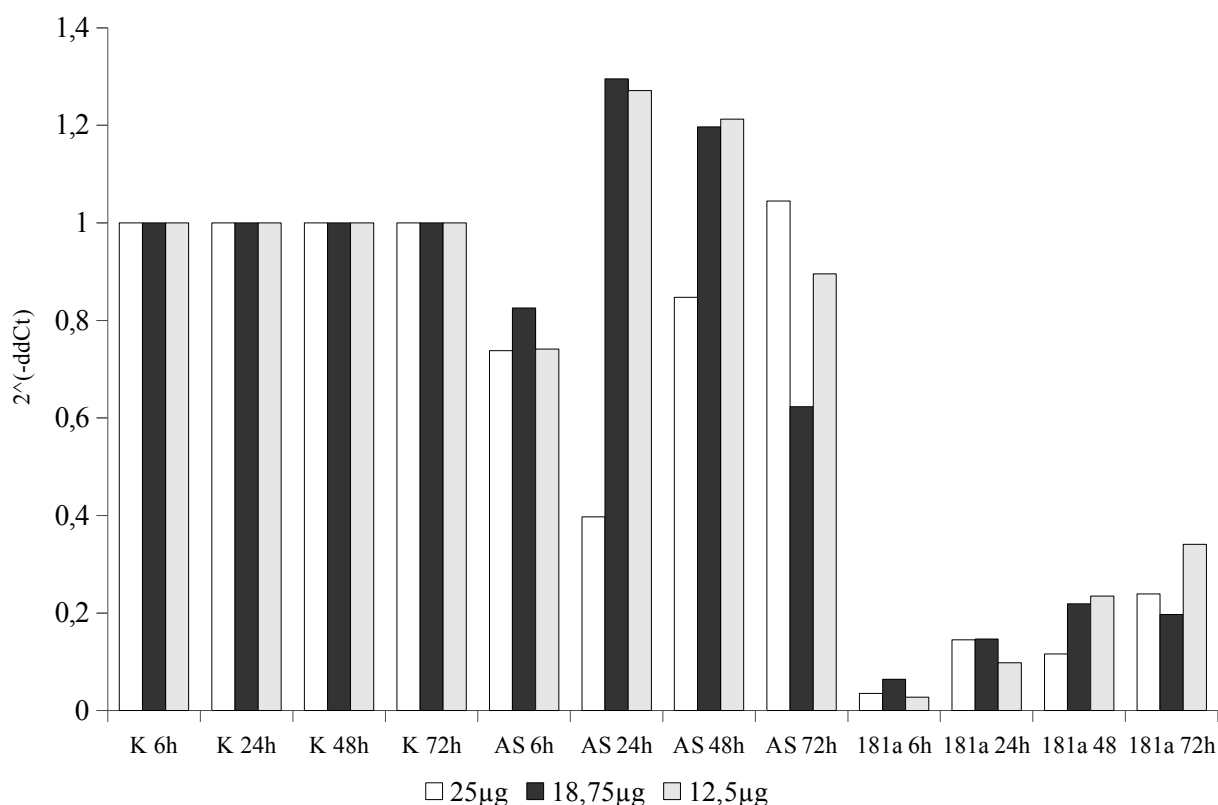


Abbildung 17: Expression der miR-181a im Verlauf der Transfektion in der Zelllinie REH.

Dargestellt ist die relative Expression bezogen auf die Expression in der Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt. K: Kontrolle, AS: unspezifisches Oligo, 181a: miR-181a spezifisches ASO.

3.6.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Die Transfektionseffizienz wurde sowohl mittels Durchflusszytometrie als auch konfokaler Lasermikroskopie bestimmt. In Abbildung 18 sind repräsentative Bilder der durchflusszytometrischen Bestimmung und die dazugehörigen Mikroskopiebilder der einzelnen Zelllinien dargestellt.

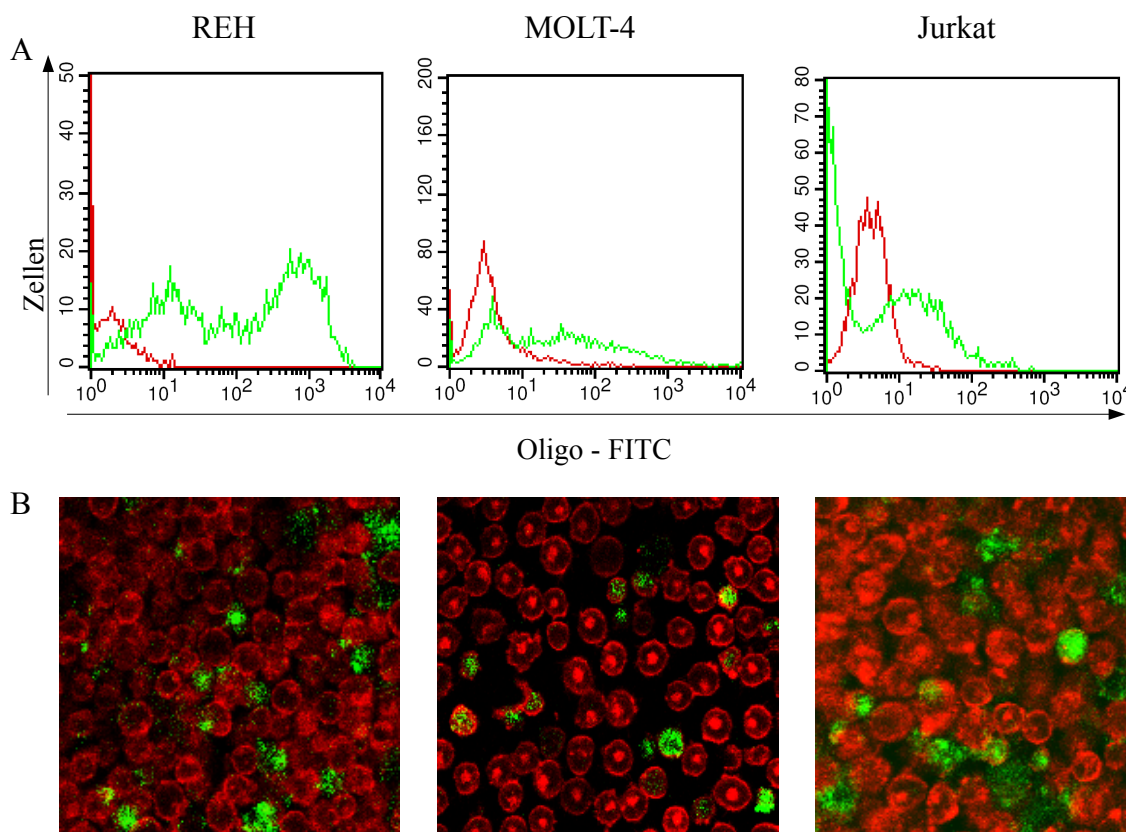


Abbildung 18: Bestimmung der Transfektionseffizienz.

Dargestellt sind die Ergebnisse je eine repräsentativen Transfektionsexperiments.

A: Transfektionseffizienz-Bestimmung mittels Durchflusszytometrie, rot dargestellt ist die Kontrolle (mit Wasser transfiziert), grün die Fluoreszenz des transfizierten Oligonukleotides. B: Transfektionseffizienz-Bestimmung mittels konfokaler Lasermikroskopie, rot angefärbt ist die Membran (PKH26), grün das transfizierte Oligonukleotid.

Die durchflusszytometrische Bestimmung ergab eine Transfektionseffizienz, die mit den mittels Mikroskopie ermittelten Transfektionseffizienzen vergleichbar ist. Im Schnitt wurden nach 15 Stunden folgende Transfektionseffizienzen ermittelt:

Tabelle 18: Mittlere Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie.

Zelllinie	Mittelwert in % (Spannweite)
REH	73 (69 - 79)
MOLT-4	38 (35 - 41)
Jurkat	24 (14 - 33)

3.6.3 Expression der miR-181a im Verlauf der Inhibition

Die Expression der microRNA im Verlauf der Transfektion wurde zu jedem Zeitpunkt mittels qPCR überprüft. Es wurden von jeder Zelllinie drei unabhängige Versuche durchgeführt, die zusammenfassende Auswertung der PCR-Ergebnisse erfolgte mit der REST-Methode.

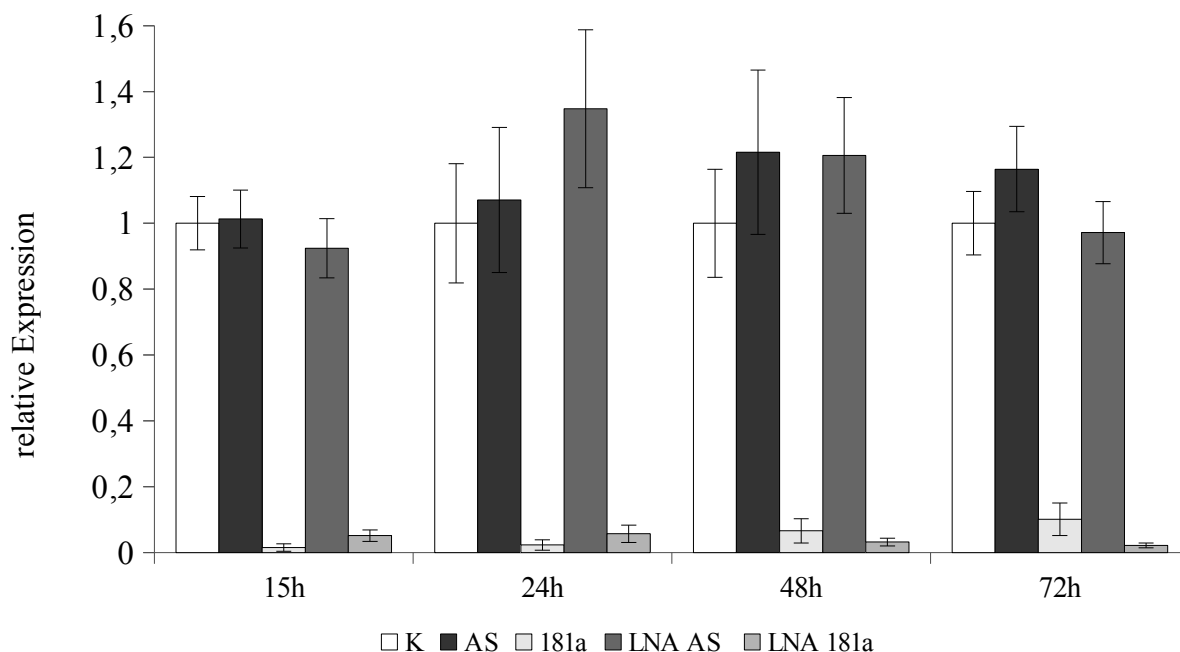


Abbildung 19: Hemmung der miR-181a in der Zelllinie REH.

Dargestellt ist die relative mittlere Expression im Vergleich zur Expression in der Kontrolle zu jedem Zeitpunkt. K: Kontrolle, AS: unspezifisches Oligo, 181a: miR-181a spezifisches ASO; n=3.

Sowohl die Transfektion mit unmodifizierten als auch mit LNA-modifizierten Oligonukleotiden führt zu einer starken Abnahme der miRNA-Expression in der Zelllinie REH (Abb. 19). Während bei den unmodifizierten Proben die stärkste Hemmung nach 15 Stunden zu beobachten ist und die Expression im Verlauf wieder zunimmt, führt die Hemmung mit LNA-modifizierten ASOs zunächst zu einer etwas schwächeren Hemmung, die im Verlauf aber noch weiter abnimmt. Alle Werte der spezifischen Oligonukleotide (modifiziert und unmodifiziert) weisen eine Signifikanz gegenüber der Kontrolle auf. Die p-Werte, ebenso wie die Ct-Werte für die einzelnen PCRs sind für die drei Zelllinien im Anhang aufgeführt (9.4).

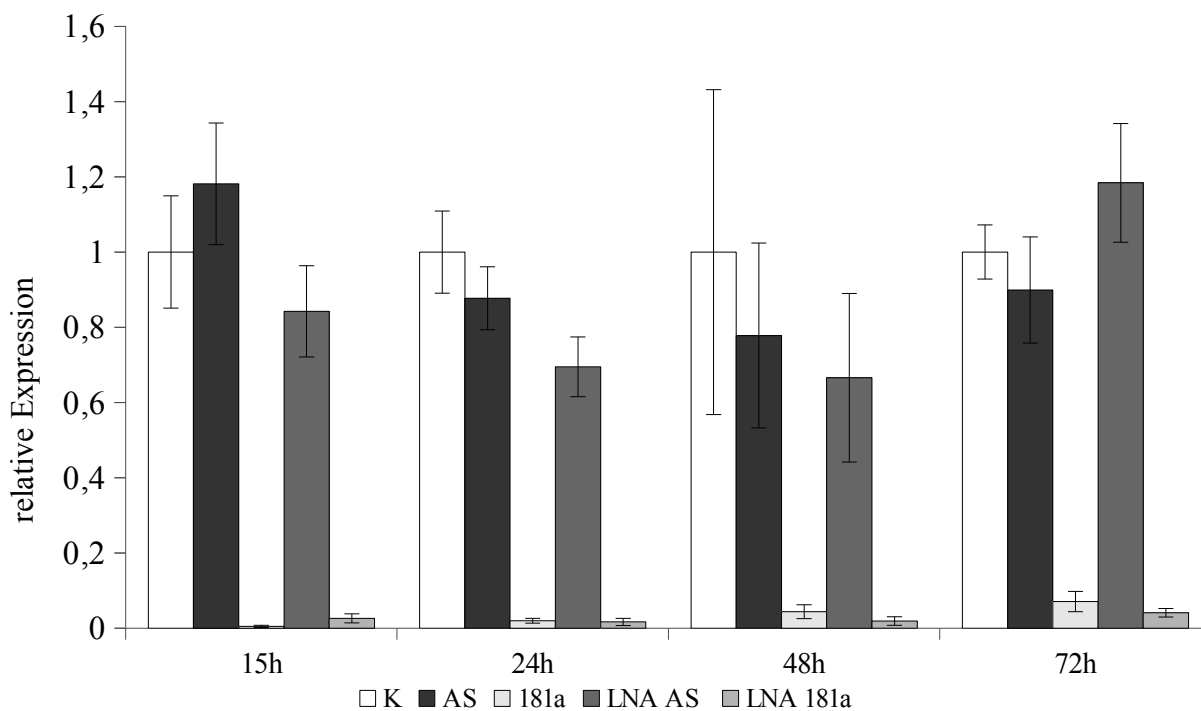


Abbildung 20: Hemmung der miR-181a in der Zelllinie MOLT-4.

Dargestellt ist die relative mittlere Expression im Vergleich zur Expression in der Kontrolle zu jedem Zeitpunkt. K: Kontrolle, AS: unspezifisches Oligo, 181a: miR-181a spezifisches ASO; n=3.

Wie auch bei der Zelllinie REH ist die Hemmung in MOLT-4-Zellen (Abb. 20) mit den unmodifizierten Oligonukleotiden nach 15 Stunden am stärksten und nimmt im Verlauf wieder zu. Die mit LNA-modifizierten ASOs behandelten Zellen zeigen die stärkste Reduktion nach 24 Stunden und danach ebenfalls eine Zunahme. Auch hier zeigen alle Proben der spezifischen Oligonukleotide eine signifikante Veränderung im Vergleich zu den Kontrollwerten (9.4).

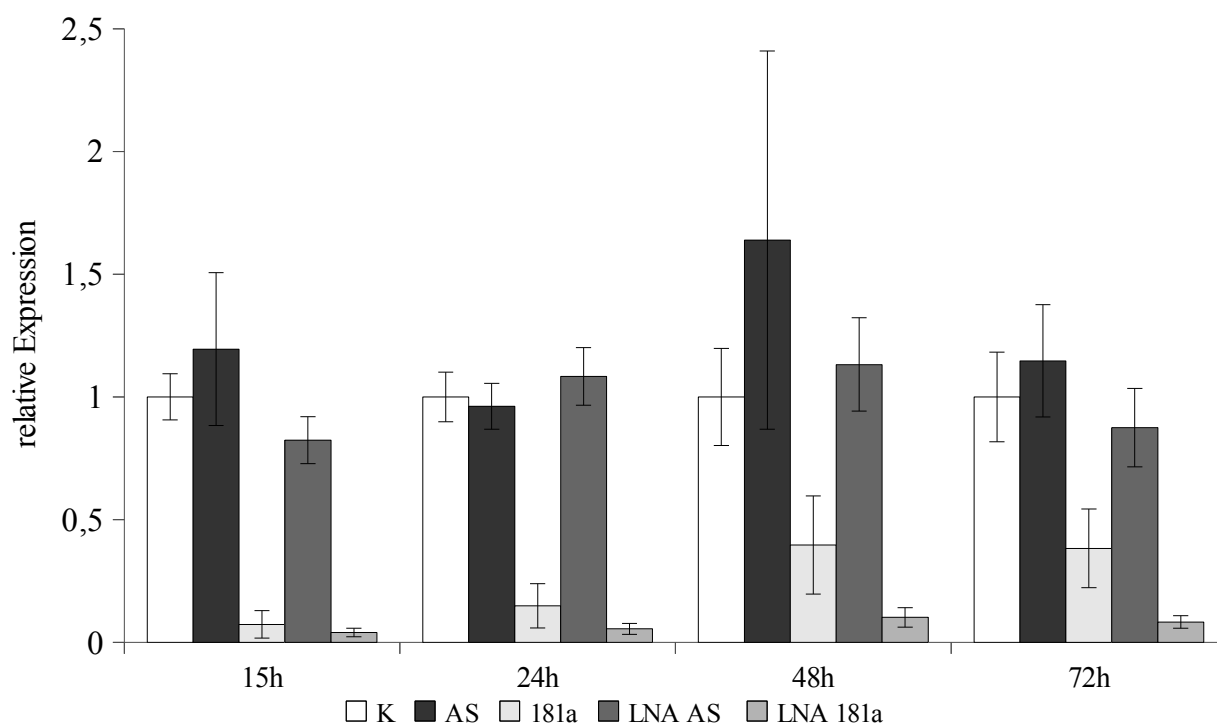


Abbildung 21: Hemmung der miR-181a in der Zelllinie Jurkat.

Dargestellt ist die relative mittlere Expression im Vergleich zur Expression in der Kontrolle zu jedem Zeitpunkt. K: Kontrolle, AS: unspezifisches Oligo, 181a: miR-181a spezifisches ASO; n=3.

In der Zelllinie Jurkat (Abb. 21) ist die Inhibition mit LNA-modifizierten ASOs über den gesamten Verlauf stärker als mit unmodifizierten ASOs. Bei beiden Oligonukleotid-Varianten ist die Hemmung nach 15 Stunden am stärksten und nimmt über den Verlauf wieder zu. Alle spezifischen Proben zeigen ebenfalls eine Signifikanz gegenüber den Kontrollansätzen (9.4).

In allen drei untersuchten Zelllinien konnte sowohl mit den unmodifizierten als auch mit LNA-modifizierten Oligonukleotiden eine Inhibition der miR-181a erreicht werden.

3.6.4 Einfluss der miR-181a Inhibition auf die Proliferation

Im Verlauf der Transfektionsversuche wurde nach 15, 24, 48 und 72 Stunden die Zellzahl mikroskopisch mittels Trypanblau-Färbung und Neubauerzählkammer bestimmt, um einen Einfluss der miRNA-Hemmung auf die Proliferation der Zellen zu ermitteln (Abb. 22). Die einzelnen Mess- sowie p-Werte sind im Anhang aufgeführt (9.6).

In allen Zelllinien und allen Proben nimmt die Zellzahl im beobachteten Zeitraum zu. Die miR-181a Inhibition führt in REH und Jurkat zu einem reduzierten Zellwachstum, allerdings waren diese Unterschiede im Vergleich zur unspezifischen Kontrolle nicht signifikant. In

MOLT-4 konnte keine Hemmung beobachtet werden. Die Kontrolle (transfiziert mit Wasser) wächst in allen Zelllinien besser als die mit einem Oligonukleotid transfizierten Zellen. Auch zeigen die Zellen, die mit einem LNA-modifizierten ASO behandelt wurden, ein geringeres Wachstum als mit unmodifizierten ASOs transfizierte Zellen.

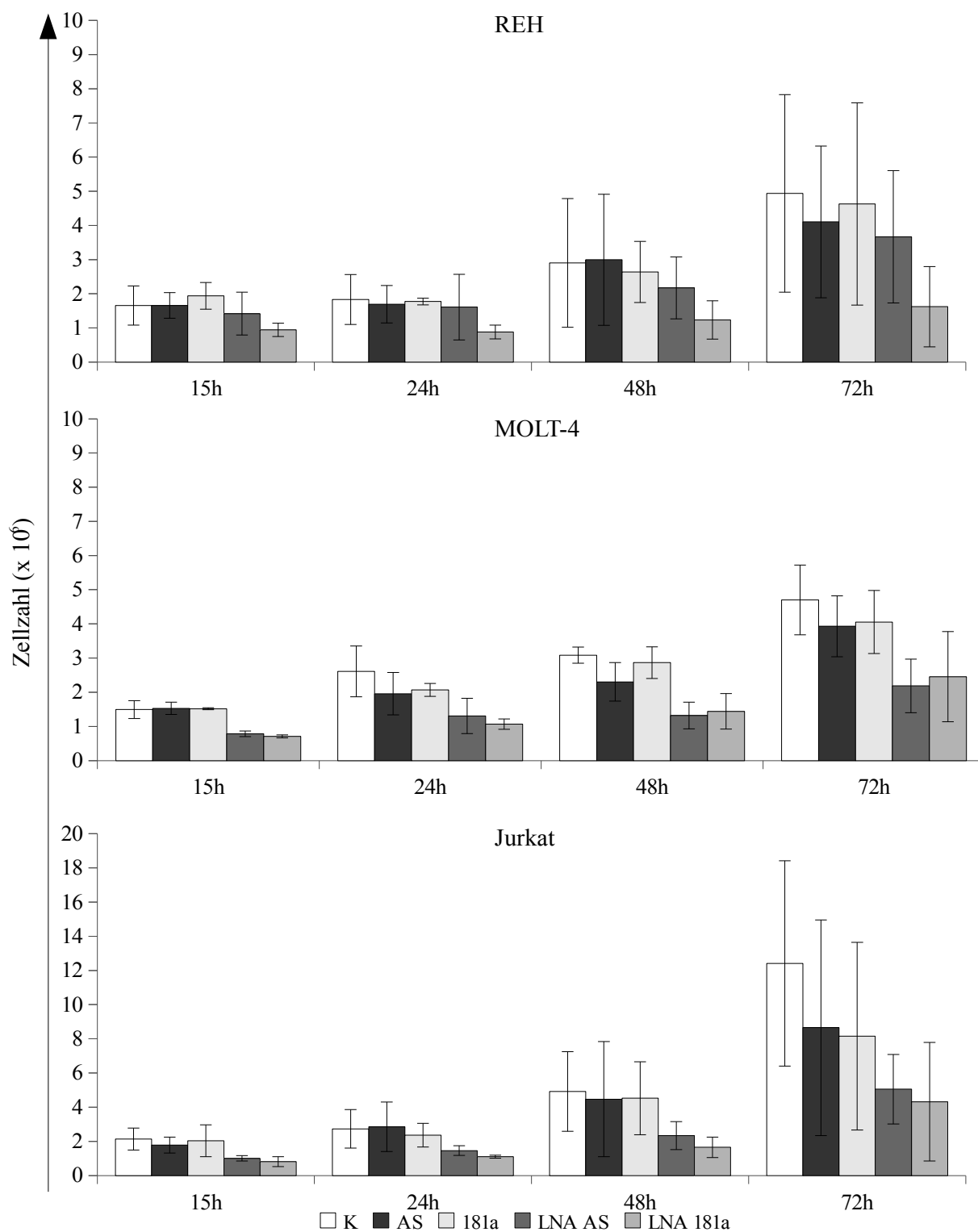


Abbildung 22: Einfluss der miR-181a-Inhibition auf die Zellproliferation.

Dargestellt sind die mittleren Zellzahlen einschließlich Standardabweichungen der verschiedenen Ansätze. K: Kontrolle, AS: unspezifisches Oligo, 181a: miR-181a ASO; n=3.

Die Hemmung der miR-181a Expression ist sowohl mit LNA-modifizierten als auch mit unmodifizierten ASOs möglich (siehe 3.6.3), und beide Methoden zeigen keine Unterschiede im Einfluss auf die Proliferation. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen zeigten die LNA-modifizierten Oligonukleotide einen größeren Einfluss auf die Expression einiger potenzieller Zielgene der miR-181 (HMGB1 und CD4), so dass in den weiteren Abschnitten nur die Ergebnisse der mit LNA-modifizierten ASOs transfizierten Zellen dargestellt werden. Die Ergebnisse, welche gleichzeitig mit unmodifizierten Oligonukleotiden erzielt wurden, sind im Anhang (9.6, 9.13, 9.15) zusammengefasst.

3.6.5 Einfluss der miR-181a Inhibition auf die metabolische Aktivität

In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der WST-1 Tests zusammengefasst. Es zeigt sich eine Zunahme der metabolischen Aktivität im Verlauf der Transfektion. Dies passt zu der beobachteten Zunahme der Zellzahl. Der Vergleich der verschiedenen Versuchsansätze zeigt keinen Einfluss der miR-181a Inhibition auf die metabolische Aktivität der Zellen. Die Messwerte sowie die Mittel- und Signifikanzwerte sind im Anhang aufgeführt (9.8).

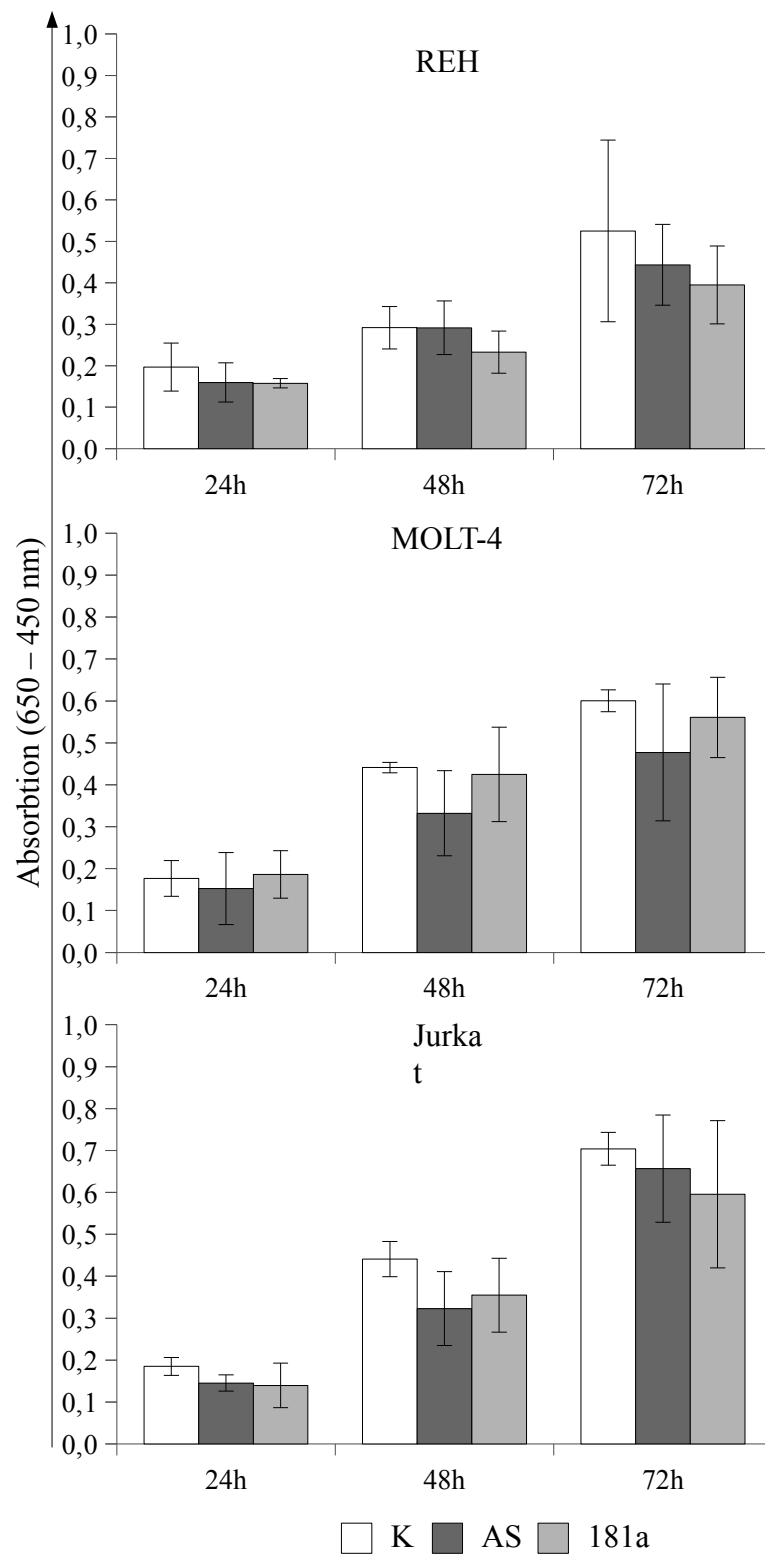


Abbildung 23: Einfluss der miR-181a Inhibition auf die metabolische Aktivität.

Dargestellt sind die mittleren Absorptionsraten einschließlich Standardabweichungen der verschiedenen Ansätze. K: Kontrolle, AS: unspezifisches Oligo, 181a: miR-181a ASO; n=3.

3.6.6 Einfluss der miR-181a Inhibition auf Apoptose und Nekrose

Um einen möglichen Einfluss der miR-181a auf den programmierten Zelltod zu ermitteln, wurden die Annexin V Bindung und das PI Färbeverhalten durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind grafisch in Abbildung 24 dargestellt.

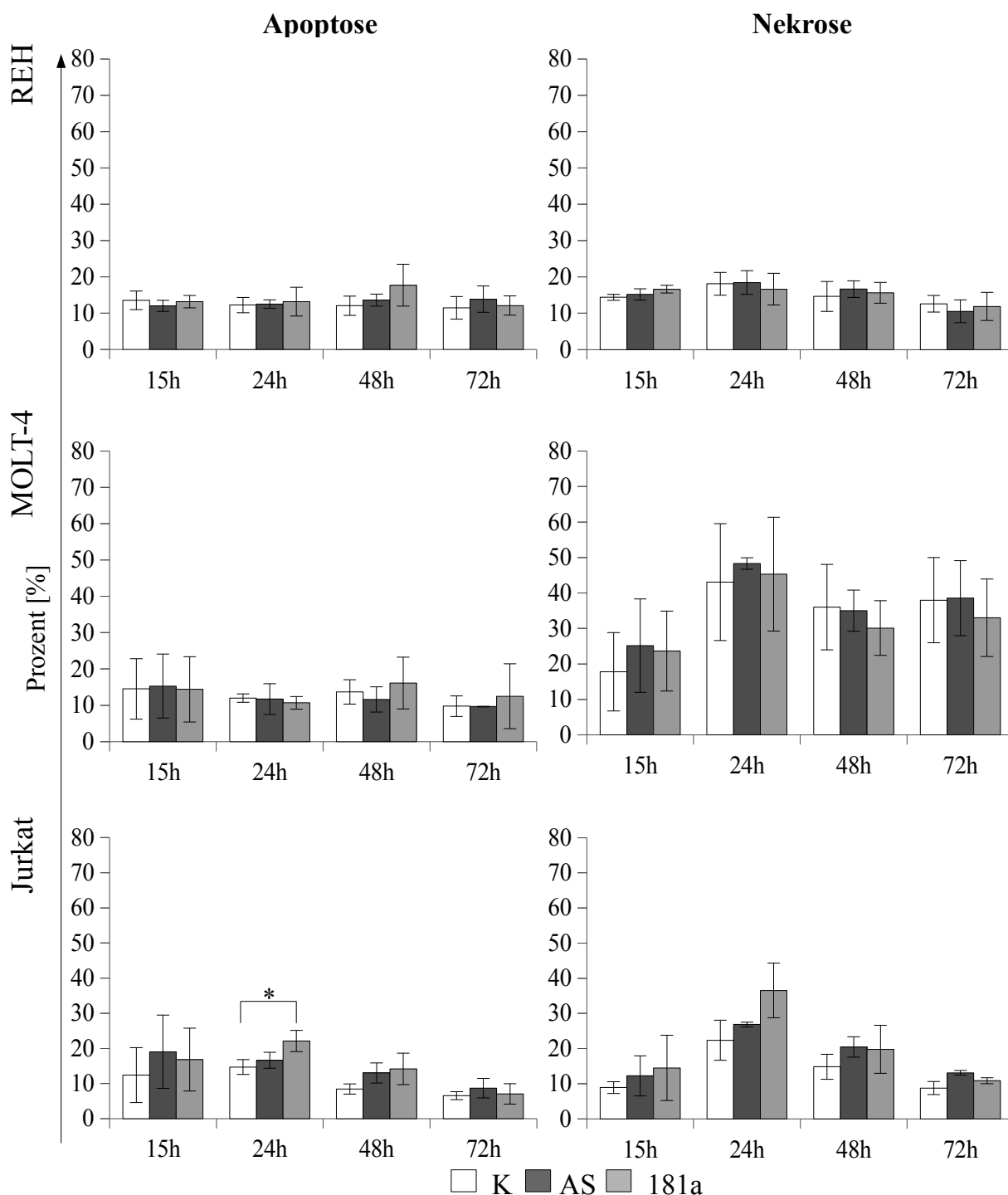


Abbildung 24: Apoptose- und Nekroserate nach miR-181a Inhibition.

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung an Prozent positiver Zellen der verschiedenen Ansätze. K: Kontrolle, AS: unspezifisches Oligo, 181a: miR-181a ASO; n=3.

Bei den Zelllinien REH und MOLT-4 konnten keine Unterschiede in der Apoptose- oder

Nekroserate zwischen den Kontrollansätzen und den miR-181a inhibierten Proben festgestellt werden. Die Zelllinie Jurkat zeigt nach 24 Stunden eine signifikant höhere Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0,03$), der Wert gegenüber der Probe mit unspezifischen ASOs ist ebenfalls erhöht ($p = 0,07$).

Die Nekroserate zeigt in allen Zelllinien einen leichten Anstieg nach 24 Stunden und nimmt im weiteren Verlauf erneut ab. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsansätzen beobachtet werden. Die genauen Messdaten sowie die p-Werte sind im Anhang zusammengefasst (9.9 und 9.11).

3.6.7 Einfluss der miR-181a Inhibition auf die Expression von Oberflächenantigenen

Der miR-181a wird eine Rolle in der Hämatopoese zugeschrieben, in der sie die Differenzierung von multipotenten Progenitoren hemmt und die Entwicklung von lymphoiden Vorläufern fördert [74]. In Abbildung 25 ist beispielhaft die Expression verschiedener hier untersuchter Oberflächenmoleküle in untransfizierten Zellen im Dot-Plot dargestellt.

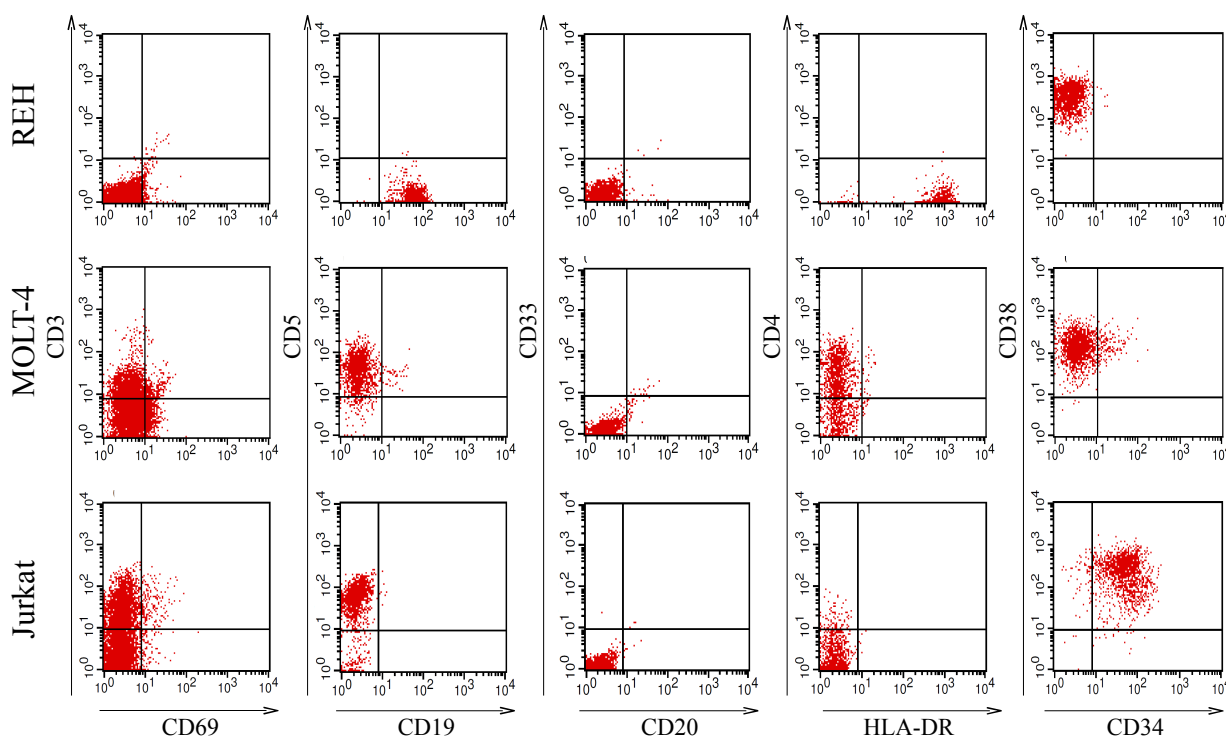


Abbildung 25: Expressionsprofil der untersuchten Oberflächenantigene in unbehandelten Leukämie-Zelllinien.

Dargestellt ist die Expression von CD3, CD69, CD5, CD19, CD33, CD20, CD4, HLA-DR, CD38 und CD34 in nicht transfizierten Zellen.

Die durchflusszytometrische Analyse dieser Oberflächenantigene ergab nur geringfügige Veränderungen im Verlauf der miR-181a Inhibition (Abb. 26). In der Betrachtung der Anzahl positiven Zellen in Prozent konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsansätzen ermittelt werden.

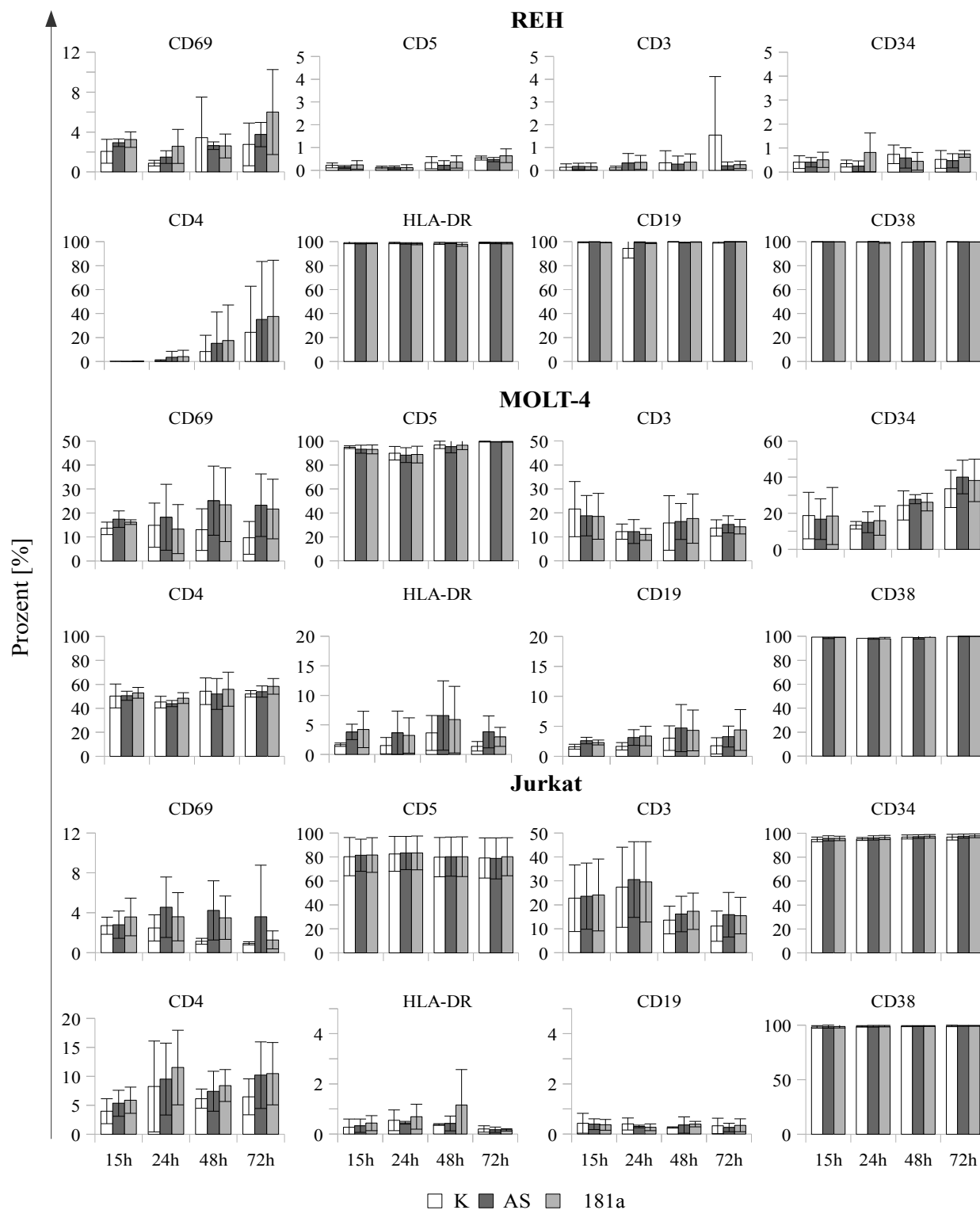


Abbildung 26: Expression der Oberflächenantigene nach miR-181a Inhibition.

Dargestellt in Prozent bezogen auf die viablen Zellen. K: Kontrolle, AS: unspezifisches Oligo, 181a: miR-181a ASO; n=3.

Für eine detailliertere Auswertung wurde neben dem Vergleich der prozentual positiven Zellen eine Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) durchgeführt. Hierbei wird nicht die Anzahl positiver Zellen, sondern die Intensität des Signals verglichen. So sind Veränderungen in der Stärke der Expression deutlicher zu erkennen. Die Normierung auf die Werte der Kontrolle und ein anschließender Vergleich der relativen MFI ergab eine signifikant höhere Expression von CD4 nach 15 und 24 Stunden in miR-181a inhibierten MOLT-4 Zellen (Abbildung 27 und Tabelle 19).

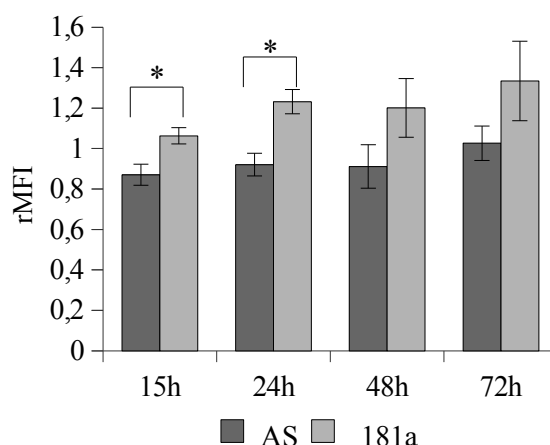


Abbildung 27: Expression von CD4 nach miR-181a Inhibition.

Dargestellt ist die relative mittlere Fluoreszenzintensität, bezogen auf die mittlere Fluoreszenzintensität der Kontrolle. Eine signifikante Veränderung wurde bei $p \leq 0,05$ angenommen und mit einem Stern (*) gekennzeichnet. AS: unspezifisches Oligo, 181a: miR-181a ASO; $n=3$.

Tabelle 19: Relative mittlere Fluoreszenzintensität für CD4 nach miR-181a Inhibition.

	Mittelwert rMFI		Standardabweichung		p
	AS	181a	AS	81a	
15h	0,87	1,06	0,05	0,04	0,008
24h	0,92	1,23	0,06	0,06	0,003
48h	0,91	1,2	0,11	0,14	0,055
72h	1,03	1,33	0,09	0,2	0,098

Die mittlere Fluoreszenzintensität stieg über den gesamten Versuchsablauf in den mit miR-181a spezifischen Oligonukleotiden transfizierten Zellen an. Aufgrund der größeren Standardabweichungen nach 48 und 72 Stunden wiesen jedoch nur die frühen Werte eine signifikante Veränderung im Vergleich zu der unspezifischen Kontrolle auf.

Die Expression von CD5 und CD69 zeigten keine Veränderungen im Verlauf der miR-181a Hemmung.

3.6.8 Einfluss der miR-181a Inhibition auf die Expression von HMGB1

Es wurden im Verlauf der Transfektionsversuche Proteinproben entnommen und mittels Western Blot und einem anti-HMGB1-spezifischen Antikörper detektiert. In Abbildung 28 sind ein repräsentativer Western Blot je Zelllinie dargestellt.

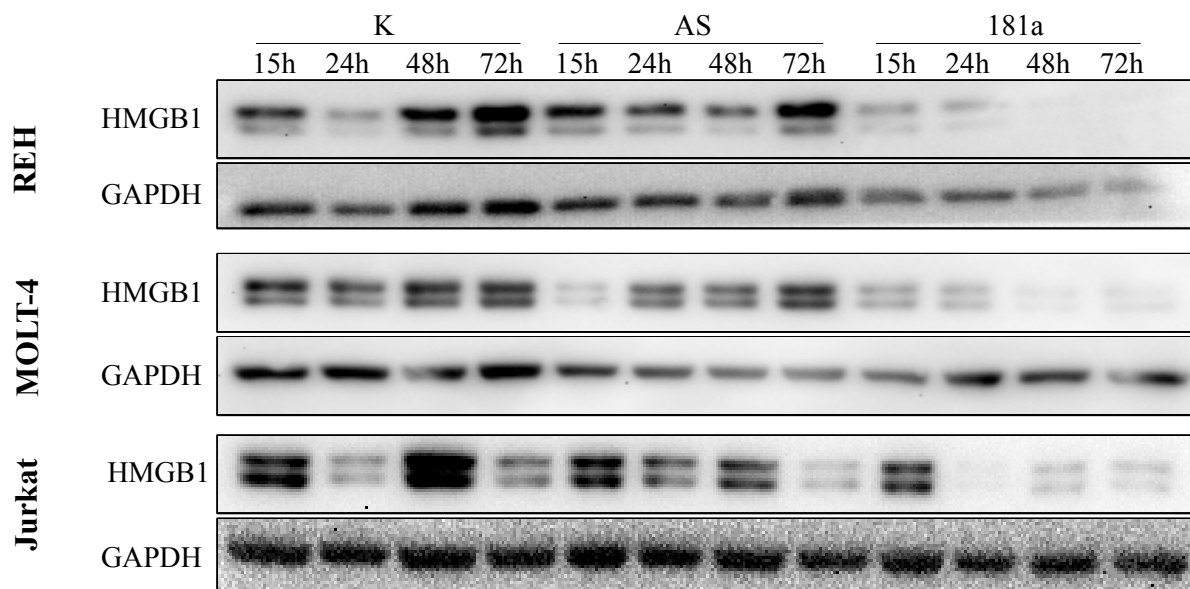


Abbildung 28: Expression des HMGB1 Proteins nach miR-181a Inhibition.

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot je Zelllinie. K: Kontrolle, AS: unspezifisches Oligo, 181a: miR-181a ASO.

In allen drei Zelllinien nahm die HMGB1-Expression auf Proteinebene in den mit miR-181a spezifischem Oligonukleotid behandelten Zellen im Verlauf ab. Bei REH und MOLT-4 waren nach 15 und 24 Stunden noch schwache Banden detektierbar, die nach 48 und 72 Stunden nicht mehr nachweisbar waren. Jurkat zeigte nach 15 Stunden eine Expression, die dem Niveau der Kontrollen entsprach. Nach 24 Stunden konnte kein HMGB1 mehr detektiert werden, die Expression nahm nach 48 Stunden langsam wieder zu.

Zusätzlich zu der Expression auf Proteinebene wurde in REH-Zellen die HMGB1-Expression auch auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Real-Time-PCR nachgewiesen. In Abbildung 29 ist die relative Expression im Vergleich zur Kontrolle dargestellt.

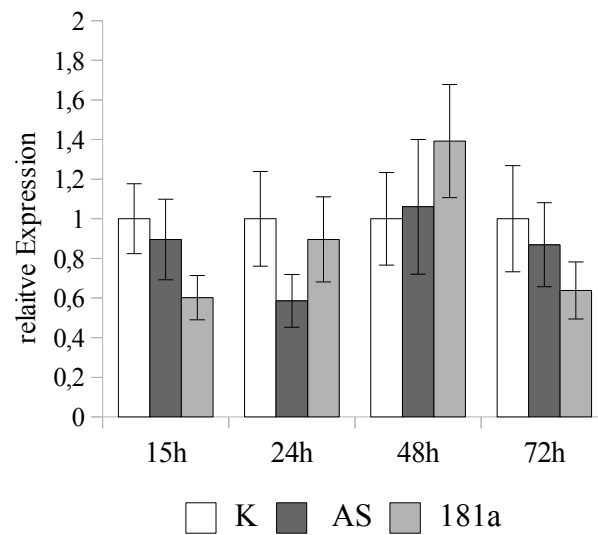


Abbildung 29: Expression der HMGB1 mRNA nach miR-181a Inhibition.

Dargestellt ist die mittlere, relative Expression. K: Kontrolle, AS: unspezifisches Oligo, 181a: miR-181a ASO.

Es konnten keine Unterschiede in der HMGB1-mRNA-Expression festgestellt werden. Der Einfluss der miR-181a auf HMGB1 ist somit nur auf Proteinebene nachweisbar.

3.6.9 Einfluss der miR-181a Inhibition auf die Phosphorylierung der Akt-Kinase

Die Aktivität des PI3K-Akt-Signalweges wurde ebenfalls im Western Blot untersucht. Hierzu wurden Antikörper, die nur die an Serin 473 phosphorylierte Form von Akt detektieren, verwendet. In Abbildung 30 ist ein repräsentativer Blot je Zelllinie dargestellt.

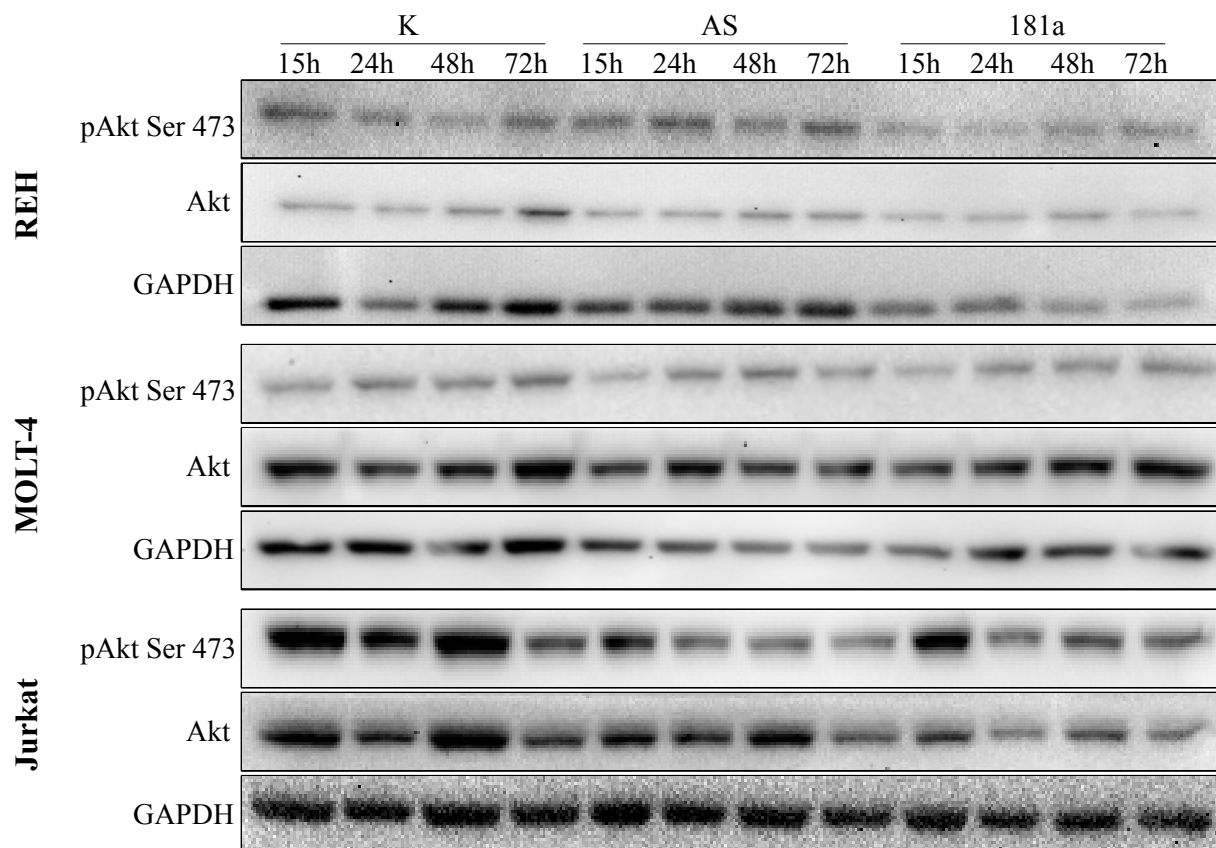


Abbildung 30: Phosphorylierung der Akt-Kinase nach miR-181a Inhibition.

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot je Zelllinie. K: Kontrolle, AS: unspezifisches Oligo, 181a: miR-181a ASO.

Die Hemmung der miR-181a zeigte keinen Einfluss auf die Aktivität des PI3K-Akt-Signalwegs, die Phosphorylierung der Akt-Kinase war in allen Proben im Beobachtungszeitraum vergleichbar.

3.6.10 Einfluss der miR-181a Inhibition auf die Expression von PTEN

Die Expression von PTEN wurde ebenfalls auf Proteinebene im Western Blot nachgewiesen. Die Zelllinien MOLT-4 und Jurkat weisen eine PTEN-Deletion auf, so dass ein möglicher Einfluss der miR-181a Inhibition nur in der Zelllinie REH überprüft werden konnte. In Abbildung 31 ist ein repräsentativer Western Blot dargestellt.

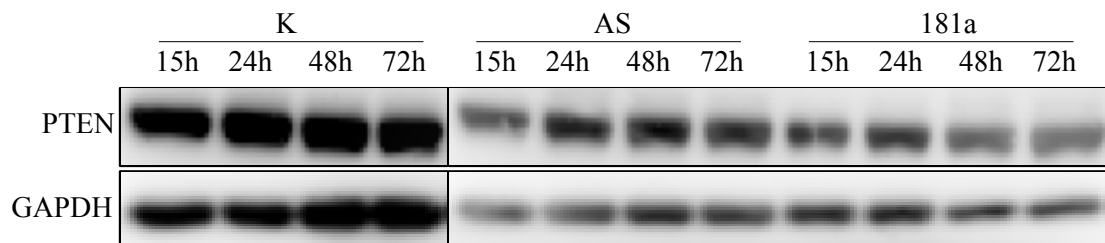


Abbildung 31: Expression des PTEN in REH Zellen nach miR-181a Inhibition.

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot je Zelllinie. K: Kontrolle, AS: unspezifisches Oligo, 181a: miR-181a ASO.

Die PTEN-Expression in den miR-181a inhibierten Proben war über den Beobachtungszeitraum mit der Expression in den Kontrollansätzen vergleichbar.

3.7 Überexpression der miR-181a in Zellen der akuten Leukämie

Um die mittels Inhibition ermittelten Zielgene der miR-181a zu bestätigen, wurde eine Überexpression durch Transfektion eines Oligonukleotides, das die Sequenz der reifen miRNA aufweist, durchgeführt. Im Verlauf wurde die miRNA-Expression, die Zellproliferation, die metabolische Aktivität, die Expression von CD4 (nur in MOLT-4-Zellen) sowie die HMGB1-Expression (in REH Zellen, auf Proteinebene) untersucht. Darüber hinaus wurde die Zelllinie HL60 transfiziert, die im Vergleich mit HSZ die geringste miR-181a Expression der untersuchten Zelllinien aufweist (Abb. 11).

3.7.1 Bestimmung der Transfektionseffizienz in HL60

Die Transfektionsrate wurde bei den Überexpressionsversuchen ebenfalls mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Lasermikroskopie bestimmt. Wie schon bei den ALL-Zelllinien zeigte sich eine gute Vergleichbarkeit der beiden Methoden. Es wurde im Schnitt eine Transfektionsrate von 57,7 % (52,4 – 63,9 %) nach 24 Stunden erzielt (Abb. 32).

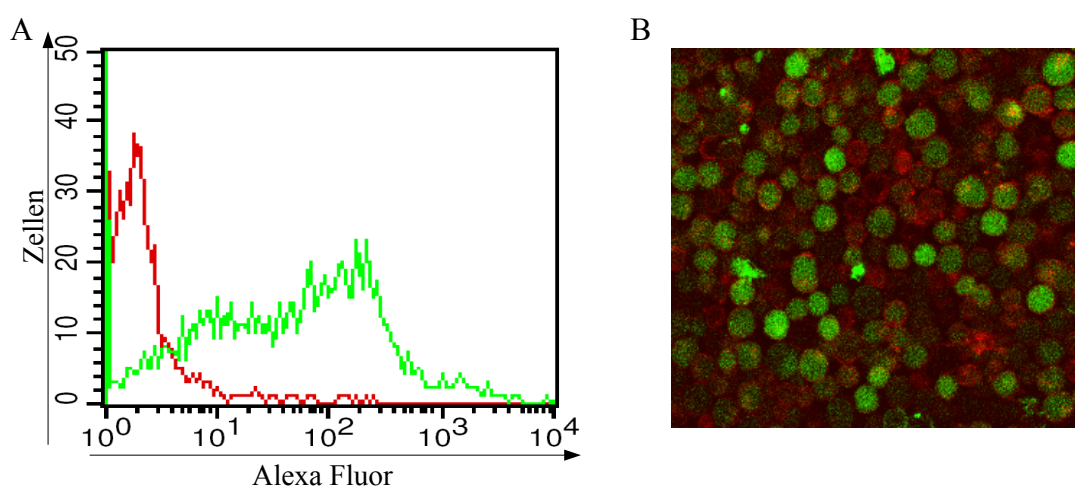


Abbildung 32: Bestimmung der Transfektionsrate in HL60-Zellen.

Dargestellt sind die Ergebnisse je eine repräsentativen Transfektionsexperiments.

A: Transfektionseffizienz-Bestimmung mittels Durchflusszytometrie, rot dargestellt ist die Kontrolle (mit Wasser transfiziert), grün die Fluoreszenz des transfizierten Oligonukleotides. B: Transfektionseffizienz-Bestimmung mittels konfokaler Lasermikroskopie, rot angefärbt ist die Membran (PKH26), grün das transfizierte Oligonukleotid. .

3.7.2 Expression der miR-181a im Verlauf der Überexpression

Analog zu den Inhibitionsexperimenten wurde im Verlauf der Überexpression zu jedem Zeitpunkt (15, 24, 48, 72 Stunden) mittels qPCR die miRNA-Expression überprüft. Es wurden von jeder Zelllinien drei unabhängige Versuche durchgeführt, die abschließende PCR-Analyse erfolgte mit der REST-Methode (Abb. 33).

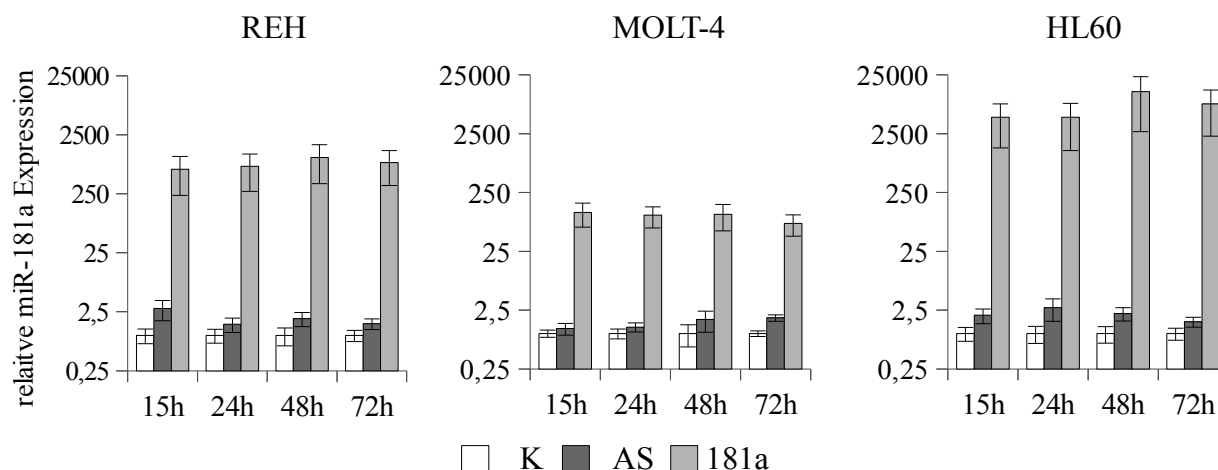


Abbildung 33: Expression der miR-181a nach Überexpression.

Dargestellt ist die relative mittlere Expression im Vergleich zur Expression in der Kontrolle zu jedem Zeitpunkt. K: Kontrolle, AS: unspezifisches Oligo, 181a: miR-181a spezifisches Oligo; $n=3$.

Die Transfektion mit einem miR-181a Mimic führt zu einer deutlichen Zunahme der miRNA-Expression. Sie ist zu jedem Zeitpunkt in jeder Zelllinie signifikant höher als in den Kontrollen. Die einzelnen Ct-Werte sowie die p-Werte sind im Anhang 9.5 aufgeführt. Es gibt jedoch Unterschiede in der Expressionshöhe zwischen den einzelnen Zelllinien.

In REH-Zellen war die höchste Überexpression nach 48 Stunden erreicht, mit einer 1000-fach höheren Expression als in der Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt. MOLT-4-Zellen zeigten bereits nach 15 Stunden die stärkste Überexpression; insgesamt jedoch war in dieser Zelllinie die geringste Überexpression zu beobachten. HL60-Zellen zeigten ebenfalls nach 48 Stunden die stärkste miRNA-Expression. Hier war der Wert im Vergleich zur Kontrolle um fast das 13000-fache erhöht.

In HL60 wurde die höchste Überexpression erreicht, nicht nur in der relativen Auswertung, sondern auch in der Betrachtung der Rohdaten. So lag der früheste Ct-Wert bei HL60 (im Schnitt) bei 13,5; in REH -Zellen bei 14,3 und in MOLT-4 Zellen bei 15,7 Zyklen.

3.7.3 Einfluss der miR-181a Überexpression auf die Zellproliferation

Entsprechend den Inhibitionsversuchen wurde zu jedem Zeitpunkt die Zellzahl mikroskopisch mittels Trypanblau-Färbung und Neubauerzählkammer bestimmt. In REH- und MOLT-4-Zellen war kein Unterschied in der Proliferation zwischen den einzelnen Versuchsansätzen zu beobachten (Abb. 34). HL60-Zellen hingegen zeigten eine verminderte Proliferation bereits nach 24 Stunden, die nach 48 Stunden gegenüber beiden Kontrollen signifikant war. Auch nach 72 Stunden war die Proliferation noch verringert, jedoch nicht mehr signifikant. Die genauen Werte sowie die Ergebnisse des t-Tests sind im Anhang 9.7 zusammengefasst.

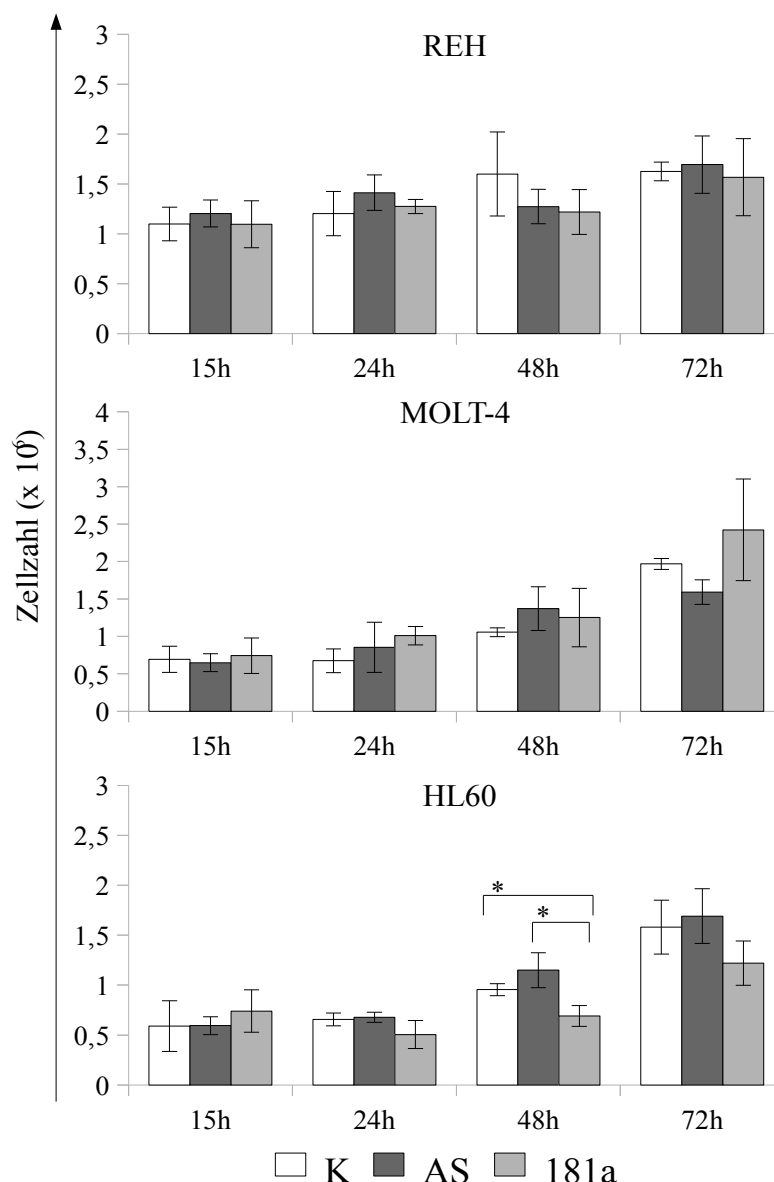


Abbildung 34: Einfluss der miR-181a Überexpression auf die Zellproliferation.

Dargestellt sind die mittleren Zellzahlen einschließlich Standardabweichungen der verschiedenen Ansätze. K: Kontrolle, AS: unspezifisches Oligo, 181a: miR-181a spezifisches Oligo; n=3.

3.7.4 Einfluss der miR-181a Überexpression auf die metabolische Aktivität

Analog zu den Inhibitionsversuchen wurde die metabolische Aktivität im zeitlichen Verlauf der Experimente bestimmt (Abb. 35).

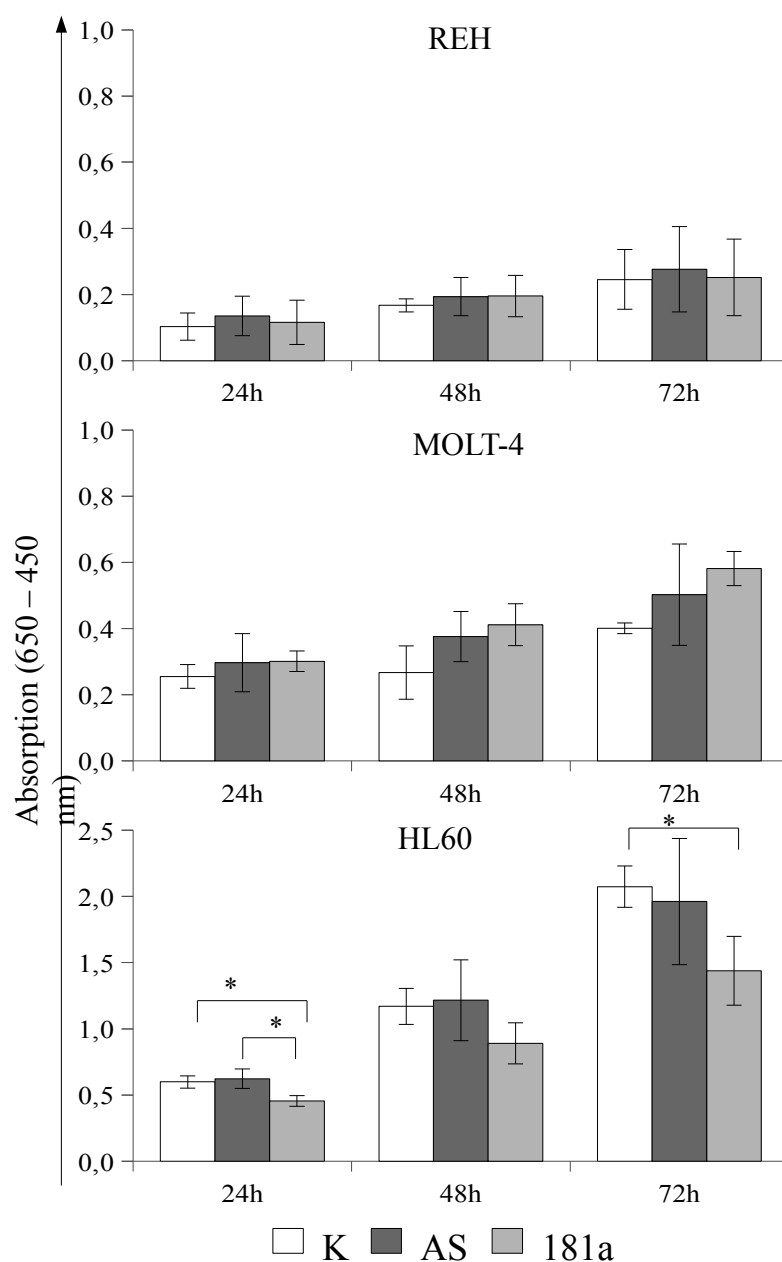


Abbildung 35: Einfluss der miR-181a Überexpression auf die metabolische Aktivität.

Dargestellt sind die mittleren Absorptionsraten einschließlich Standardabweichungen der verschiedenen Ansätze. K: Kontrolle, AS: unspezifisches Oligo, 181a: miR-181a spezifisches Oligo; n=3.

Wie schon bei der Zellzahl konnten bei REH und MOLT-4 zwischen den einzelnen Ansätzen keine Unterschiede in der metabolischen Aktivität festgestellt werden. In HL60-Zellen konnte eine verminderte metabolische Aktivität zu allen drei Zeitpunkten beobachtet werden, nach 24 und 72 Stunden waren die Unterschiede signifikant. Somit führt eine Überexpression der miR-181a in HL60-Zellen zu einer verminderten Proliferation und metabolischen Aktivität.

3.7.9 Einfluss der miR-181a Überexpression auf Apoptose und Nekrose

In HL60-Zellen konnte ein vermindertes Zellwachstum sowie eine geringere metabolische Aktivität in den miR-181a überexprimierenden Zellen festgestellt werden. Um zu ermitteln, ob dies durch ein vermehrtes Absterben der Zellen ausgelöst wird, wurde die Apoptose- und Nekroserate im zeitlichen Verlauf der Experimente bestimmt (Abb. 36).

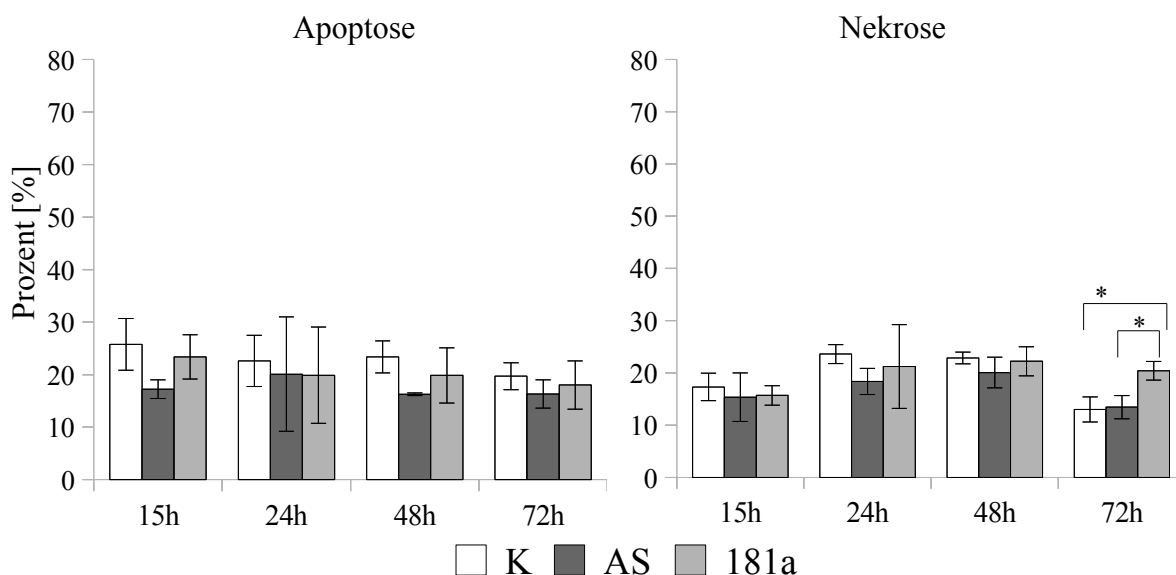


Abbildung 36: Apoptose und Nekrose in HL60 Zellen nach miR-181a Überexpression.

Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede wurden bei $p \leq 0,05$ angenommen und mit einem Stern gekennzeichnet. A: Apoptoserate, B: Nekroserate, K: Kontrolle, AS: unspezifisches Oligo, 181a: miR-181a spezifisches Oligo.

Die Apoptoserate (Abb. 36A) zeigte keine signifikanten Veränderungen im Versuchverlauf. Die Nekroserate war nach 24 und 48 Stunden leicht erhöht und fiel nach 72 Stunden in den Kontrollansätzen wieder ab. Die miRNA-überexprimierenden Proben zeigten nach 72 Stunden eine signifikant erhöhte Nekroserate als die Kontrollansätze ($p = 0,02$ vs. K und $p = 0,01$ vs. AS, Abb. 36B).

3.7.5 Einfluss der miR-181a Überexpression auf die Expression von CD4

Basierend auf den Vorhersagen, dass die CD4-mRNA eine miR-181a Bindestelle besitzt (1.1.4, Tabelle 1) und den in Abschnitt 3.6.7 beschriebenen Effekt einer Hemmung der miR-181a auf die Expression von CD4 berücksichtigend wurde auch im Verlauf der Überexpressionsversuche die CD4-Expression in MOLT-4 Zellen ermittelt (Abb. 37).

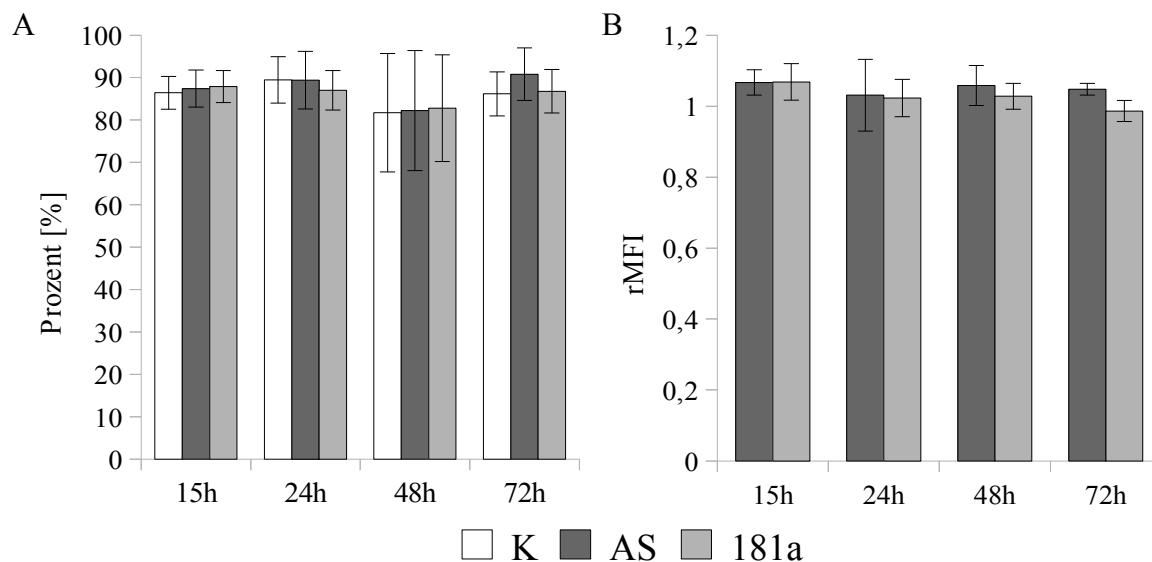


Abbildung 37: Expression von CD4 nach miR-181a Überexpression.

Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. A: prozentuale Auswertung, B: Auswertung über die relative mittlere Fluoreszenzintensität (rMFI). K: Kontrolle, AS: unspezifisches Oligo, 181a: miR-181a spezifisches Oligo.

Es konnte weder in der prozentualen Auswertung noch in der mittleren Fluoreszenzintensität ein Unterschied in der CD4 Expression in den Ansätzen beobachtet werden.

3.7.6 Einfluss der miR-181a Überexpression auf die Expression von HMGB1

Analog zur Expression von CD4 wurde die Expression des HMGB1 in REH-Zellen mittels Western Blot im zeitlichen Verlauf des Experimentes untersucht. In Abbildung 38 ist ein repräsentativer Western Blot dargestellt.

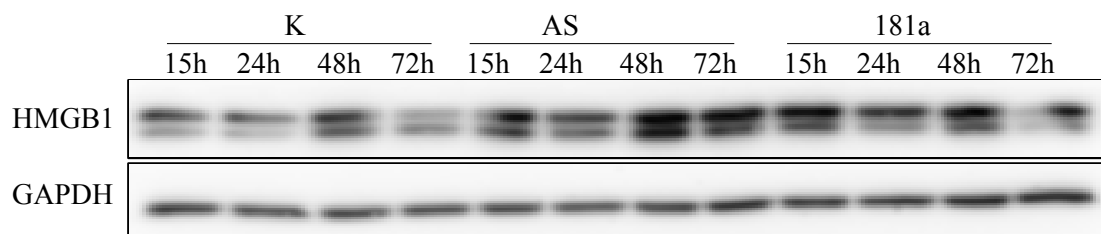


Abbildung 38: Expression des HMGB1 in REH Zellen nach miR-181a Überexpression.

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot. K: Kontrolle, AS: unspezifisches Oligo, 181a: miR-181a spezifisches Oligo.

Die Expression des HMGB1 schwankte in allen Versuchsansätzen während des Beobachtungszeitraums. Das Haushaltsgen GAPDH wurde in allen Proben gleichmäßig detektiert, so dass in allen Proben die gleiche Menge Protein aufgetragen wurde. Es konnte kein Einfluss der miRNA Überexpression festgestellt werden.

3.7.7 Einfluss der miR-181a Überexpression auf die Phosphorylierung von Akt

Die Inhibitionsversuche konnten keinen Einfluss der miR-181a auf die Phosphorylierung von Akt zeigen. Als Bestätigung wurde dies auch im Verlauf der Überexpressionsversuche untersucht (Abb. 39).

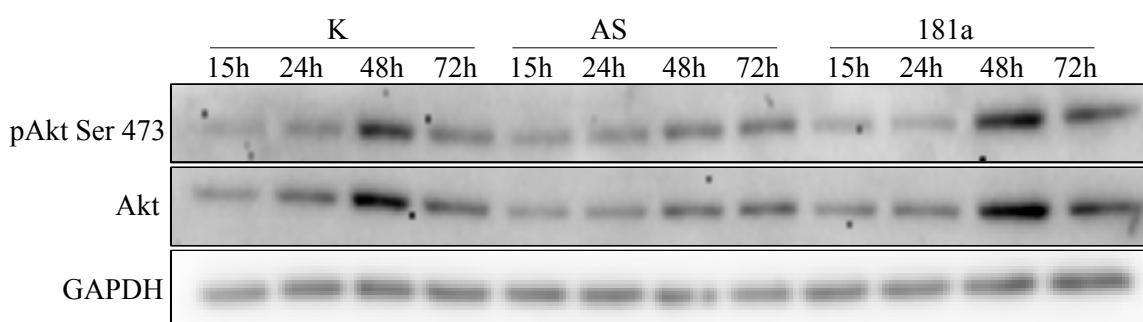


Abbildung 39: Phosphorylierung von Akt in REH Zellen nach miR-181a Überexpression.

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot. K: Kontrolle, AS: unspezifisches Oligo, 181a: miR-181a spezifisches Oligo.

Der Phosphorylierungsstatus korrelierte mit der Expression des Gesamtproteins von Akt, so dass wie schon in den Inhibitionsversuchen kein Einfluss der miR-181a beobachtet werden konnte.

3.7.8 Einfluss der miR-181a Überexpression auf die Expression von PTEN

Analog zu der Phosphorylierung von Akt wurde auch die Expression von PTEN im Verlauf der Überexpression überprüft um einen Effekt der miR-181a auszuschließen. In Abbildung 40 ist ein repräsentativer Western Blot dargestellt.

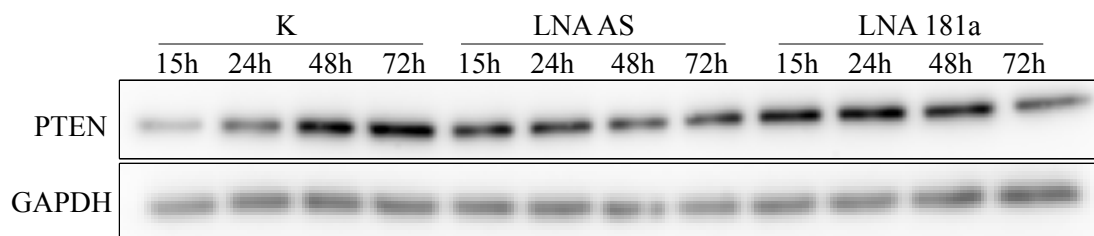


Abbildung 40: Expression von PTEN in REH Zellen nach miR-181a Überexpression.

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot. K: Kontrolle, AS: unspezifisches Oligo, 181a: miR-181a spezifisches Oligo.

Es konnten keine Unterschiede in der Expression zwischen den Kontrollen und den miRNA-spezifischen Proben festgestellt werden. Die PTEN-Expression scheint somit nicht durch die miR-181a beeinflusst zu werden.

4. Diskussion

MicroRNAs bilden eine neue Klasse regulatorischer RNA-Molekülen, über deren Funktion und Bedeutung bei physiologischen und pathologischen Prozessen gegenwärtig nur limitierte Daten existieren. Die Rolle von miRNA-Dysregulationen bei der Entstehung akuter Leukämien ist unklar. Aufgrund dessen wurden in der vorliegenden Disserationsarbeit Screeningverfahren zur miRNA-Expression bei gleichen zytogenetischen Veränderungen sowie funktionelle Untersuchungen zur Rolle der miR-181a in akuten Leukämien durchgeführt. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse dieser Experimente mit dem aktuellen Stand der Literatur verglichen und diskutiert.

4.1 Identifizierung differentiell exprimierter miRNAs in akuten Leukämien mittels Microarrays

In der vorliegenden Arbeit sollte ein miRNA-Expressionsprofil mittels Microarrays erstellt werden. Der Schwerpunkt lag auf der Identifizierung von miRNAs, die spezifisch für eine Translokation t(4;11)(q21;q23) sind. Hierzu wurde die miRNA-Expression in gesunden HSZ, gesunden B-Zellen sowie drei leukämischen Zelllinien untersucht. Es handelte sich um zwei Vorläufer-B-ALL-Zelllinien (SEM und RS4;11) und eine AML-Zelllinie des Subtyps M5b (MV4;11). Alle Zelllinien weisen neben anderen eine Translokation der Chromosomen 4 und 11 auf, die zu dem Fusionsprodukt MLL-AF4 führt. Es wurde eine Zweifarben-Analyse durchgeführt, bei der die Expression der einzelnen Populationen gegenüber der mittleren Expression aller untersuchten Zellen bestimmt wurde. Es wurde die LNA-Technik der Firma Exiqon verwendet. Sie benutzt sogenannte LNA-modifizierte Oligonukleotide, die eine höhere Sensitivität und Spezifität gegenüber nicht-modifizierten Oligonukleotiden aufweisen. Dadurch wird eine deutlich geringere Menge RNA benötigt als bei konventionellen Microarrays. Auch war eine Anreicherung der miRNAs aus der isolierten Gesamt-RNA nicht notwendig. Vorab ist festzustellen, dass Microarrays eine potente Screeningmethode darstellen, um Hypothesen zu generieren, die in weiterführenden Experimenten überprüft werden müssen.

Insgesamt konnten 53 miRNAs identifiziert werden, die in mindestens einer der Populationen eine signifikante Veränderung gegenüber der mittleren Expression aller Proben aufweisen. Im folgenden werden 15 dieser signifikant veränderten miRNAs und ihre mögliche Rolle im hämatopoetischen System weiter diskutiert. Fünf weitere miRNAs (miRs-451, 365, 103, 193a-3p, 98) und ihre Funktionen werden aus Gründen der Übersichtlichkeit im Anhang 9.1 diskutiert.

Drei miRNAs zeigen eine starke Expression in CD34+ HSZ und nur eine schwache Expression in B-Zellen bzw. den Zelllinien: die miRs-451, 126 und 130a. Während die miR-451 in allen Zelllinien sowie in B-Zellen einen Expressionswert unter -2 zeigt, fallen bei den miRs 126 und 130a je ein Wert mit einer Expression um 0 auf (in MV4;11 bzw. SEM). Die miRs 126 und 130a werden im folgenden, die miR-451 im Anhang 9.1 diskutiert.

Das *miR-126*-Gen liegt innerhalb des *EGFL7*-Gens auf Chromosom 9 und zeigt in vielen Tumoren eine korrelierende Expression mit dessen mRNA [75]. Der gesamte Vorläufer der miRNA befindet sich in einer CpG-Insel mit 29 CpG Dinukleotiden. Li *et al.* konnten 2008 zeigen, dass dieser Bereich bei Patienten mit einer sogenannten CBF-AML (core-binding factor) deutlich weniger Methylierungen aufweist als bei Patienten ohne solche Mutationen. Die Behandlung mit demethylierenden Reagenzien wie Decitabin und Trichostatin A führt zu einem Anstieg der miRNA-Expression [76]. Eine Studie von Garzon *et al.* zeigt eine verminderte Expression der miR-126 in AML-Patienten versus gesunden CD34+ Zellen [73]. Darüber hinaus zeigt die miR-126 in AML Patienten mit einer MLL-Translokation oder einer t(15;17) eine niedrige Expression im Vergleich zu den anderen untersuchten Subgruppen [76], dies konnte jedoch in der erste Studie zur miRNA-Expression in AML mit MLL-Translokationen nicht gezeigt werden [77]. Die miR-126 zeigt außerdem eine vermehrte Expression im Knochenmark von MDS-Patienten im Vergleich zu gesundem Knochenmark [71] und spielt eine wichtige Rolle sowohl in der Megakaryopoese (mit einer abnehmenden Expression) [78] und der Erythropoese (durch eine gesteigerte Expression im Vergleich zu HSZ) [79]. Eine Überexpression führt in AML-Zellen zu einer verminderten Sensitivität gegenüber Etoposid sowie einer allgemein höheren Zellviabilität [76]. Dieser Effekt wird vermutlich durch eine Beeinflussung der Polo-like-kinase 2 (PLK2) vermittelt, die in die Kontrolle der durch DNA-Schäden aktivierten Kontrollpunkte des Zellzyklus involviert ist. Als weitere Zielgene konnten die in die Angiogenese involvierten Proteine SPRED1 und VCAM identifiziert werden [80-81]. Interessanterweise zeigen Hu *et al.*, dass MLL-AF4 positive Leukämiezellen eine Vielzahl an proangiogenetischen Zytokinen produzieren, aber dennoch nicht zu einer vermehrten Bildung von Endothelzellen in einem Matrixgel oder im Xenograftmodell führen [82]. Guo *et al.* konnten im Jahr 2008 zeigen, dass die miR-126 die Translation der p85 β Untereinheit der PI3K negativ beeinflusst und so auch die Phosphorylierung und die Aktivität der Akt-Kinase reguliert [83]. Von den untersuchten Zelllinien zeigt SEM die geringste miR-126 Expression, aber die stärkste Phosphorylierung von Akt, wohingegen MV4;11 den höchsten Wert der Zelllinien zeigt, aber auch die geringste Aktivität von Akt (persönliche Kommunikation mit Frau Dipl. Biol. Catrin Schult). Zusätzlich zu den bisher erwähnten Zielgenen konnte auch das Homeobox Protein A9 identifiziert werden [28]. HOXA9 spielt eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung von Stammzellfunktionen sowie der Differenzierung von myeloiden und T-Zellen und ist häufig

überexprimiert in myeloiden Leukämien [84]. Darüber hinaus ergab der Vergleich der zwei Datenbanken miRCOSM und targetscan, dass verschiedene Zink-Finger-Proteine (wie ZFYVE9 und ZFPM2), die eine Verbindung zur Hämatopoese aufweisen, ebenso wie das Protein WNT10A, das häufig in APL und Burkitt-Lymphomen stark exprimiert wird eine miR-126 Bindestelle besitzen. Die Proteine HOXA5 und D1 stellen ebenso wie FOSL1 wichtige genregulatorische Proteine dar, die eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Proliferation von Zellen spielen. Ebenso gehören mit TNF2, CD69 und CCL1 (Chemokin Ligand 1) verschiedene Proteine in der Signalübertragung des Immunsystems zu den potentiellen Zielgenen der miR-126.

Das Gen der miR-130a liegt auf Chromosom 11q12, jedoch weit vor dem Bruchpunkt der Translokation t(4;11). Die miRNA 130b, welche die gleiche Seedsequenz besitzt, zeigt ein unterschiedliches Expressionsmuster mit einem negativen Wert in den gesunden Zellen und einer leicht (RS4;11) bzw. mäßig starken Expression in SEM und MV4;11. Die Expression der miR-130a nimmt während der Megakaryopoese stark ab und beeinflusst dabei negativ die Expression des Transkriptionsfaktors MAFB, der eine essentielle Rolle bei dieser Differenzierung spielt [78]. Sorrentino *et al.* konnten zeigen, dass die miR-130a in Eierstockkrebszellen das Zytokin MCSF-1 reguliert, der wichtig in der frühen Phase der Makrophagen-Differenzierung ist [85]. Zusätzlich zeigt diese Arbeit eine unterschiedliche Expression der miR-130a in Zelllinien, die eine Resistenz gegenüber Cisplatin, Paclitaxel oder gegenüber beiden Zytostatika aufweisen im Vergleich zu nicht resistenten Zellen. Einen weiteren Einfluss der miR-130a auf Differenzierungsprozesse durch eine negative Regulierung der HOXA5 mRNA konnten Chen *et al.* zeigen [86]. HOXA5 spielt wie alle HOX-Gene eine Rolle in der Hämatopoese und eine Inaktivierung durch Hypermethylierung des Gens führt zu einer schlechten Prognose bei CML-Patienten [87]. Zusätzlich zeigt HOXA5 einen aktivierenden Einfluss auf den Promotor des Onkogens p53 [88]. Der Transkriptionsfaktor FOG2, der die Aktivität von verschiedenen, für die Hämatopoese wichtigen GATA-Proteinen moduliert, wird ebenfalls durch die miR-130a reguliert [89]. Zusätzliche, mittels Datenbanken identifizierte und für die Hämatopoese wichtige Zielgene der miR-130a sind der Transkriptionsfaktor IKZF2 (wichtig in der frühen Hämatopoese), IL13 (Zytokin in der späten B-Zell-Reifung), der Chemokin Ligand 7 (lockt Makrophagen an), der Transkriptionsfaktor E2F5 (involviert in die Zellzykluskontrolle) sowie CDC34 (benötigt für die Degradierung der G1-Regulatoren und die Replikationsinitiation).

Die miR-29 Familie (miR-29abc) sowie die miR-150 zeigen eine starke Expression in B-Zellen, jedoch nur geringe Werte in HSZ bzw. den Zelllinien.

Die Mitglieder der miR-29 Familie liegen in zwei Clustern auf Chromosom 7 (miR-29a, miR-29b-1) und Chromosom 1 (miR-29b-2, miR-29c). Sie weisen eine gleiche Seedsequenz auf

und sind zu 86-95% zueinander homolog. Ihre Expression wird direkt durch Promotorbindung von MYC negativ reguliert [90], sie wird aber auch durch Änderungen der Chromatinstruktur beeinflusst [91] und durch NF κ B-abhängige Signalwege unterdrückt [92]. Alle miR-29s zeigen eine höhere Expression in B-Gedächtniszellen als in Zentroblasten [93]. In CLL-Zellen (Stadium A) zeigen sie eine deutlich höhere Expression als in ALL-Zellen [94]. Jedoch konnten verschiedene Studien zeigen, dass bei CLL-Patienten häufig eine zu niedrige Expression der miR-29 vorliegt [95]. Diese wird durch eine Deletion des langen Arms des Chromosoms 11 ausgelöst, die in 5-10% der CLL-Fälle auftritt. Eine Studie von Stamatopoulos *et al.* aus dem Jahr 2009 konnte zeigen, dass der Expression der miR-29 eine prognostische Bedeutung in der CLL zukommt und eine niedrige Expression mit einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit einhergeht [96]. Wagner *et al.* beobachteten eine Hochregulierung der miR-29 Expression während der Alterung (Kultivierung) von mesenchymalen Stammzellen [97]. Bei AML-Patienten zeigt die miR-29 eine niedrigere Expression im Vergleich zu HSZ [73]. Dies wird durch die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt: hier liegt die Expression der Zelllinie MV4;11 auf einem Niveau mit der Expression in HSZ. AML-Patienten mit einer Mutation im NPM1-Gen zeigen eine höhere miR-29 Expression als Patienten ohne eine solche Veränderung [98].

Bisher wurden verschiedene Ziel-mRNAs der miR-29 beschrieben. Dazu zählt das TCL1-Protein, das einen Coaktivator der Akt-Kinase darstellt [42] und ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der CLL spielt [99]. Das MCL1-Protein, das zur antiapoptotischen BCL2-Familie zählt und in vielen chemotherapieresistenten Zellen überexprimiert wird [100], wird ebenfalls negativ durch die miR-29 beeinflusst [101]. Die miR-29 Familie übt darüber hinaus einen aktivierenden Effekt auf den p53-Weg aus, indem sie die Proteine p85 α (regulatorische UE der PI3K) und CDC42 hemmt [102]. Xu *et al.* beschrieben 2009 eine Beeinflussung der B7-H3-mRNA durch die miR-29 [103]; dieses Glykoprotein (auch CD276) stellt einen Inhibitor von T- und NK-Zellen dar und wird durch LPS induziert. Zusätzlich greift die miR-29 in die Genexpression ein, indem sie die beiden DNA-Methyltransferasen DNMTa und DNMTb negativ beeinflusst. Eine Überexpression der miRNAs führt zur Wiederherstellung des endogenen Methylierungsprofils und einer normalen Genexpression [104]. Des Weiteren wurde mit der Hemmung des Proteins Tristetraprolin ein weiterer, allgemeingültiger Einfluss auf die Genexpression beschrieben, da dieses Protein den Abbau der Poly-A-Schwänze von mRNAs kontrolliert [105]. Als potenzielle Zielgene konnten verschiedene Transkriptionsfaktoren bzw. -aktivatoren (CNOT8, FOXJ2, GLIS2, HIF3A, HBP1, ISL1, TAF11, TBX21), immunmodulatorische und hämatopoetische Proteine (IFI30, MLF1, NKRF, SRCRB4D, TNFRSF1A), apoptotische Proteine (Caspase 7, Diablo), Signalmoleküle bzw. -modulatoren (DUSP2, FRAT2) sowie Proteine mit epigenetischem Einfluss (CLK2, H2AFY, SETDB1) identifiziert werden. Interessanterweise hat auch die mRNA des Proteins CHIC2 eine potenzielle miR-29 Bindestelle; dieses Protein ist in eine Translokation t(4;12) in einigen AML-Fällen involviert.

Die miR-150 zeigt ebenfalls eine starke Expression in B-Zellen und nur eine schwache in allen anderen Proben. Der einzige bekannte Genlocus der miR-150 liegt auf Chromosom 19 ohne weitere miRNAs in unmittelbarer Umgebung. Ebenso sind bisher keine bekannten miRNAs mit einer Sequenzhomologie gefunden worden. Sie ist nach Landgraf *et al.* eine der fünf hämatospezifischen miRNAs [34]. Sie spielt eine entscheidende Rolle in der Lymphozyten-Differenzierung, in dem sie die Reifung der pro-B-Zellen zu prä-B-Zelle blockiert [106]. *In vivo* Experimente zeigen bei einer Überexpression in unreifen Stammzellen einen gleich bleibenden Anteil an pro-B-Zellen, gemeinsam mit einer deutlichen Abnahme der prä-B-Zellen sowie der unreifen und reifen B-Zellen. Diese drei Zelltypen weisen in diesen Versuchen eine leicht erhöhte Apoptoserate auf [106]. MiR-150 knockout.-Mäuse zeigen einen starken Anstieg von B1-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe [107]. Ebenso zeigen naive und Gedächtnis-B-Zellen eine höhere miR-150 Expression als Keimzentrums B-Zellen [108]. Auch steigt die Expression der miR-150 während der T-Zell-Reifung an [106]. Wu *et al.* konnten, wie schon für die B-Zellen beschrieben, eine hohe Expression in naiven T-Zellen messen, die in Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen deutlich abnimmt [109]. Cobb *et al.* konnten zeigen, dass die ektopische Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 zu einer Reduzierung der miR-150 Expression führt [110]. Darüber hinaus ist diese miRNA maßgeblich an der Linien-Entscheidung der myeloid-erythroiden Vorläuferzellen beteiligt, in dem sie bei einer hohen Expression die Ausreifung zu Megakaryozyten begünstigt. Megakaryozyten zeigen konsequenterweise eine deutlich höhere miR-150-Expression auf als Erythrozyten [111]. Bei MDS-Patienten mit einer del(5q) bzw. einem geringen zytogenetischem Risiko wurde eine erhöhte Expression festgestellt [112], ebenso wie in CLL-Zellen vs. gesunden B-Zellen [113]. Jedoch zeigt sie eine geringere Expression in den Zellen der Proliferationszentren von CLL-Patienten im Vergleich zu den anderen CLL-Zellen der gleichen Patienten [114]. Hodgkin-Lymphome zeigen im Vergleich zu non-Hodgkin-Lymphomen ebenfalls eine geringere miR-150 Expression [115].

Bisher wurden zwei Faktoren identifiziert, welche die miR-150 Expression beeinflussen: zum einen der Transkriptionsfaktor MYC, ohne dass jedoch eine direkte DNA-Bindestelle in der Umgebung des *miR-150*-Gens ermittelt werden konnte [90]. Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe von Barroga *et al.* im Jahr 2008 einen Einfluss von Thrombopoetin auf die Expression der miR-150 zeigen [116]; dies steht jedoch im Widerspruch zu Garzon *et al.*, die keine Unterschiede in der miR-150 Expression bei Thrombopoetin-Behandlung beobachten konnten [78]. Viele der Effekte der miR-150 in der Hämatopoese können mit einer Beeinflussung des Transkriptionsfaktors c-MYB durch die miR-150 erklärt werden. Dieser wurde von Xiao *et al.* als Ziel mRNA der miR-150 identifiziert [107]. In vielen Fällen korreliert die MYB-Expression negativ mit der miR-150 Expression [111-112;116]. Zusätzlich konnte eine negative Korrelation mit dem Transkriptionsfaktor FOXP1 (Regulator der B-Zell-Differenzierung) und des Apoptoseinhibitors Survivin beobachtet werden [108]. Darüber hinaus beeinflusst die miR-150

die Aktivität der Caspase 9 [117], sowie die Expression des proapoptotischen Proteins P2X₇ (ATP-Rezeptor, der an der Makrophagen-Lyse beteiligt ist) [118]. Als weitere potenzielle Zielgene wurden verschiedene Transkriptionsfaktoren (FIXD3, GTF3C2), Signalmoleküle (MAPK13, REPS2, RORB) sowie das DNA-Bindeprotein MBD6 und das Onkogen p53 beschrieben.

Im folgenden werden drei miRNAs diskutiert, die in gesunden Zellen eine niedrige und in allen drei Zelllinien eine deutlich höhere Expression aufweisen: miRs-18ab und miR-191. Die miRs 365 und 103 weisen ein ähnliches Expressionsprofil auf und werden im Anhang 9.1 diskutiert.

Beide Mitglieder der miR-18 Familie (miR-18a, miR-18b) zeigen in HSZ und B-Zellen eine schwache Expression (-0,7 - -2,5), eine geringe Expression in den B-ALLs (0 - +0,2) und eine moderate Expression in MV4;11 (+1,2). Die miR-18a liegt auf Chromosom 13 in dem miR-17-92 Cluster, welcher außer ihr noch die miRs 17, 19a, 20a, 19b-1 und 92a-1 enthält. Die miR-18b liegt ebenfalls innerhalb eines Clusters (zusammen mit den miRs 106a, 20b, 19b-2, 92a-2, 363) auf Chromosom 17. Diese miRNAs weisen alle ein den miRs-18 ähnliches Expressionsprofil auf mit Ausnahme der miR-363 (moderat in HSZ, B-Zellen und SEM um 0, schwach in RS4;11 und MV4;11). Die miRs-18a und b sind untereinander zu 96% homolog und unterscheiden sich nur an Position 20. Die Expression des miR-17-92 Clusters wird direkt am Promotor durch den Transkriptionsfaktor c-MYC reguliert [119], ebenso wie eine Bindung des Transkriptionsaktivators E2F1-3 erfolgt [120]. Interessanterweise wird E2F1-3 negativ durch die miR-20a reguliert, so dass hier eine Rückkopplung vorliegt. In Leberkarzinomen zeigt sich im Vergleich zu gesundem Gewebe eine Überexpression der miRs-18, in Magenkarzinomen jedoch eine niedrigere Expression als in den Kontrollproben [121-122]. Bei MS-Patienten weisen Blutproben, die zum Zeitpunkt eines akuten Schubes genommen wurden, eine deutlich höhere Expression der miRs-18 auf als Proben, die zwischen zwei Schüben entnommen wurden oder Kontrollproben [123]. Für die Prozessierung der pri-miR-18a ist eine Bindung durch das RNA-Prozessierungsprotein hnRNPA1 notwendig, nicht jedoch für die anderen Mitglieder des miR-17-92 Clusters. In Ratten konnte eine erhöhte Expression der miR-18 24 Wochen nach Behandlung mit dem Karzinogen 2-Acetylaminofluoren beobachtet werden [124]. HL60-Zellen, die nach TPA-Behandlung einer monozytäre Differenzierung unterliegen, zeigen eine schwächere Expression der miRs-18 als unbehandelte Zellen [125]. Yang *et al.* konnten 2009 nur in der CML-Zelllinie K562 eine Expression der miR-18 nachweisen, die im Verlauf einer erythroiden Differenzierung abnimmt [79]. AML-Zellen zeigen im Vergleich zu gesunden HSZ eine niedrigere Expression, bei Patienten mit Mutation des NPM1-Gens ist die Expression jedoch wiederum signifikant erhöht gegenüber Patienten ohne Mutation [73, 98]. Darüber hinaus zeigt eine Studie von Pons *et al.* aus dem Jahr 2009 eine erhöhte Expression bei MDS-Patienten

gegenüber gesunden Kontrollen [71]. Als durch die miR-18 beeinflusste Gene wurden bis dato die beiden Kernrezeptoren für Östrogen und für Glucokortikoide identifiziert [121,126-127]. Darüber hinaus wird die Expression des CTGF (Connective tissue growth factor) während der Chondrozyten-Differenzierung durch die miR-18 negativ beeinflusst [128]. Der Core-binding-factor α (RUNX1) wird *in vitro* ebenfalls negativ durch die miR-18 reguliert [129]. Das Protein verliert durch eine Translokation t(8;21) seine Funktionsfähigkeit (tritt in 15% der AML-Fälle auf) und führt zu einer AML M2 mit günstiger Prognose. Weitere potenzielle Ziele der miR-18 sind hauptsächlich Zellzyklus-Regulatoren mit antiproliferativen Eigenschaften (BTG3, CDK2, PTP4A3), Transkriptionsfaktoren (HMBOX1, LMO4), ein O₂-Stress-Protein (HIF1), ein DNA-Reparatur-Protein (ESCO2) sowie mit IRF2 und TNFAIP3 zwei Immunmodulatoren.

Die miR-191 zeigt eine geringe Expression in Stamm- und B-Zellen (-1,2, bzw. -1,4) und eine moderate Expression in den drei Zelllinien (+0,1 - +0,8). Sie liegt zusammen mit der miR-425 auf Chromosom 3, intronisch innerhalb des Gens *DLRD3*. Die miR-425 weist ein identisches Expressionsprofil in den untersuchten Proben auf. Die Expression der miR-191 ist Tagesrhythmus abhängig und korreliert negativ mit der Expression des Transkriptionsaktivators BMAL1, der für die Expression vieler Tagesrhythmus-Proteine zuständig ist [130]. Die miR-191 weist eine verstärkte Expression sowohl in Kolonkarzinomen als auch in Brustkrebszellen auf [131-132]. Eine Hemmung mittels ASOs führt zu einer signifikant verminderten Proliferation [133]. Bei AML-Patienten stellt eine hohe miR-191 Expression einen schlechten Prognosefaktor dar [73]. Potenzielle Zielgene sind das Protoonkogen BCL11A (in myeloiden und B-Zell-Erkrankungen dysreguliert), das an verschiedenen Signalwegen beteiligte Protein PLCD1 und das in die Kontrolle des Zellzyklus involvierte Protein RCC2.

Zwei miRNAs zeigen eine hohe Expression in den beiden B-ALL-Zelllinien, jedoch eine niedrigere Expression in HSZ, B-Zellen sowie MV4;11: miR-155 und miR-193a.

Die miR-155 zeigt eine schwache Expression in HSZ und B-Zellen (-0,5, bzw. -0,3), eine moderate Expression in SEM und RS4;11 (+1 bzw. +0,4) und ebenfalls eine schwache Expression in MV4;11 (-1,1). Sie wird von einem Genlokus auf Chromosom 21 transkribiert und liegt innerhalb des B-cell integration cluster (BIC). Sie wird von Landgraf *et al.* zu den für hämatopoetische Zellen spezifischen miRNAs gezählt [34] und spielt eine entscheidende Rolle in der Immunantwort. So steigt ihre Expression nach Antigenrezeptor-Bindung sowohl in B- als auch T-Zellen stark an [134-135]. Auch Makrophagen, Monozyten und Dendritische Zellen zeigen nach Stimulierung mit inflammatorischen Zytokinen eine verstärkte miR-155 Expression [136-137]. Die Induktion ist NF κ B und JNK-Kinase abhängig, was dem Profil eines Immun-Abwehr-Moleküls entspricht [136, 138-139]. Der für regulatorische T-Zellen (Tregs) spezifische Transkriptionsfaktor FOXP3 bindet an den Promotor des BIC-Gens, so dass konsequenterweise Tregs eine hohe miR-155 Expression zeigen. Ebenfalls wird die miR-155 durch eine latente

Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus induziert [140]. CLL-Zellen zeigen im Vergleich zu gesunden B-Zellen eine erhöhte Expression, ebenso wie in Lymphomen häufig eine Dysregulation vorliegt [141-143]. Hier liegt häufig eine defekte Prozessierung des primären Transkriptes BIC vor [138]. Bei AML-Patienten ist eine hohe miR-155 Expression mit dem Auftreten von internen Tandemduplikationen (ITD) im FLT-3 Gen assoziiert, sie ist jedoch unabhängig von der Kinase-Aktivität der FLT-3 [73, 98]. Die Zelllinie MV4;11 weist eine solche FLT-3 ITD auf, so dass sie eigentlich eine hohe miR-155 Expression zeigen müsste. Jedoch zeigt ihr Karyotyp ebenfalls eine Deletion des Chromosoms 19, so dass nur ein Genlokus zur Transkription der miR-155 zur Verfügung steht. Mäuse, die eine Deletion des *miR-155* Gens aufweisen, zeigen eine normale Hämatopoese, jedoch ist die Immunfunktion nach Stimulierung aberrant [135, 144]. Hieraus schließen die Autoren, dass die miR-155 in der Hämatopoese nur eine untergeordnete Rolle spielt. Dennoch zeigt sich bei einer Überexpression im Knochenmark von Mäusen eine myeloproliferative Veränderung, ebenso führt eine Überexpression in B-Zellen zu einer pro-B-Zell-Leukämie [145-146]. Eine Ausschaltung in myeloiden Dendritischen Zellen führt zu einer verminderten Aktivierung von T-Zellen nach Antigenpräsentation [144]. Die miR-155 scheint darüber hinaus die Entwicklung von T_H1-Zellen gegenüber T_H2-Zellen zu fördern, vermutlich durch eine Beeinflussung des Transkriptionsfaktors c-MAF [135, 144]. Eine Ausschaltung führt ebenfalls zu einem Defekt in der Keimzentrums-Bildung und verhindert den Ig-Klassenwechsel [147]. Dorett *et al.* und Teng *et al.* konnten 2008 zeigen, dass die miR-155 die Cytidin-Deaminase AID reguliert, die eine wichtige Rolle bei der somatischen Hypermutation und somit im Klassenwechsel spielt [148-149]. Als zwei weitere Ziele der miR-155 wurde der vor allem in der Immunantwort involvierte Transkriptionsrepressor CEBPB sowie die Phosphatase SHIP, die verschiedene Signalwege negativ reguliert, identifiziert [150]. Weitere potenzielle Zielgene der miR-155 verstärken die Bedeutung dieser miRNA in der Immunregulation: CFS1R (Rezeptor für IL34 und CSF1), IKBKE (Inhibitor des NFκB-Signalweges) und SOCS1 (negativer Regulator des Cytokinsignalweges via Jak/STAT). Darüber hinaus besitzen der Zellzyklusregulator WEE-1 und der für die myeloide Differenzierung essentielle Transkriptionsfaktor PU.1 (SPI1) eine miR-155 Bindestelle. Somit scheint die miR-155 vor allem in der Immunregulation eine entscheidende Rolle zu spielen und für die normale Hämatopoese von untergeordneter Bedeutung zu sein, besonders da eine Ausschaltung zu keinen Veränderungen in der Zusammensetzung der Blutzellen führt.

Zwei miRNAs weisen eine zum Teil starke Expression in RS4;11 und MV4;11 und nur eine geringe Expression in SEM, HSZ und B-Zellen auf: miR-34a und miR-98.

Die mir-34a weist eine sehr schwache Expression in HSZ, B-Zellen und SEM auf (-1,2 - -1,7), eine moderate Expression in RS4;11 (+0,8) und eine sehr starke Expression in MV4;11 (+3,6). Sie gehört zur miR-34 Familie, zusammen mit den miRs 34b und 34c. Beide weisen nur

eine schwache Expression in allen Proben auf (miR-34b) bzw. konnten nicht detektiert werden (miR-34c). Die Mitglieder der miR-34-Familie weisen zwar die gleiche Seedsequenz auf, darüber hinaus ist die Homologie jedoch gering (50 – 60%). Die miR-34a liegt unabhängig von anderen Strukturen auf Chromosom 1, die beiden Anderen liegen in einem Cluster auf Chromosom 11, vor dem Bruchpunkt im MLL-Gen. Die miR-34a ist Teil des durch p53 regulierten Netzwerkes von Tumor-Suppressoren. Die Expression wird durch p53 induziert und führt zu vermehrter Apoptose und Zellzyklus-Arrest [151-153]. Aktivatoren von p53 (wie z.B. Nutlin 3a) führen ebenfalls zu einer verstärkten miR-34a Expression [154]. Die Zelllinie MV4;11 zeigt im Codon 344 (Exon 9) des p53-Gens eine A→G Punktmutation, die den Austausch eines Histidins durch eine Arginin zur Folge hat und so zu einer verstärkten Aktivität des Proteins [155]. Dies dürfte zu der stark erhöhten miR-34a Expression in dieser Zelllinie führen. Interessanterweise konnten Yamakuchi *et al.* SIRT-1 als Zielgen der miR-34a identifizieren [161]. SIRT-1 deacetyliert p53 und führt so zu einer verminderten Transkriptionsaktivität von p53 und einer Apoptosehemmung. Somit besteht eine positive Rückkopplung zwischen p53 und der miR-34a, vermittelt durch eine Hemmung von SIRT-1. Diese wird jedoch durch eine langfristige Gabe von 2-Acetylaminofluoren unterbrochen, was zu einer vermehrten Apoptose führt [124]. In 15% der CLL-Fälle liegt eine 17p13 Deletion vor, welche zu einem Verlust des p53-Gens führt. Diese Zellen zeigen ebenfalls eine verminderte miR-34a Expression [158]. Das Onkogen c-MYC führt hingegen, vermittelt durch direkte Promotorbindung zu einer Hemmung der miR-34a Expression [90]. Viele Tumore weisen eine starke Methylierung und somit eine Stilllegung des miR-34a Gens auf, welche auch die Gene der miRs 34bc betrifft [156]. Diese geschlossene Chromatinstruktur ist dominant gegenüber der Transkriptionsaktivierung von p53. Bei ALL-Proben zeigen besonders die miRs-34bc eine solche Veränderung auf [157], die ebenfalls in den hier untersuchten Zelllinien vorliegen könnte und somit die geringere Expression der miR-34b erklären würde. Ebenso könnte hier der Unterschied in der miR-34a Expression zwischen SEM und RS4;11 liegen.

Zenz *et al.* schreiben der miR-34a eine Rolle bei der Resistenzentwicklung in CLL-Zellen zu, da ihre Expression in verschiedene Subgruppen der CLL unterschiedlich stark ist [159]. Während der Differenzierung von Monozyten zu Dendritischen Zellen (MDDC, monocyte derived dendritic cells) steigt die Expression der miR-34a an, eine Hemmung der miRNA Expression führt ebenfalls zu einer Hemmung der Differenzierung [160]. Die Autoren zeigen eine Regulation der beiden Proteine WNT-1 und JAG1 durch die miR-34a, wodurch die Differenzierung beeinflusst wird. Darüber hinaus werden viele Zellzyklus-Regulatoren durch die miR-34a reguliert, wie z.B. CDK6, Cyclin D1 und E2F3 [162-163]. Auch die beiden Onkogene MYCN und c-MET werden negativ durch die miR-34a beeinflusst. Unter den bioinformatisch vorhergesagten Zielgenen der miR-34a befinden sich ebenfalls verschiedene Zellzyklus-Regulatoren (CDKN1C, UHRF2), Signalmoleküle (LGR4, RALGDS, RPS6KA4) sowie die

DNA-Bindeproteine FOSB und FOSL und der Transkriptionsfaktor ZNF281. Aus hämatologischer/immunologischer Sicht interessant ist ein möglicher Einfluss der miR-34a auf DLL1, ein Ligand verschiedener NOTCH-Rezeptoren, der die B-Zell-Reifung blockiert, und auf FKBP1B, das an der immunsuppressiven Antwort der Zelle auf Rapamycin beteiligt ist.

Die miR-128 weist als einzige miRNA eine starke Expression in SEM und MV4;11 auf (0,75 bzw. 1,3), nicht jedoch in den gesunden Zellen oder der Zelllinien RS4;11 (-2,4 - -2,9). Sie wird von zwei verschiedenen Genloci transkribiert, beide liegen intronisch innerhalb von mRNA-Genen. Sie weist eine starke Expression in neuronalen Zellen auf und ist wesentlich an der Entwicklung des Gehirns beteiligt, so dass Dysregulierungen in neuronalen Tumoren nachgewiesen werden konnten [164-166]. Darüber hinaus ist sie Teil einer Signatur, welche Lymphknoten-negative, Östrogen-Rezeptor-positive Brustkrebszellen von anderen Brustkrebs-Subtypen unterscheidet [167]. Sie zählt ebenfalls zu der von Marcucci *et al.* postulierten miRNA-Signatur bei AML-Patienten, dessen hohe Expression mit einer schlechten Prognose einhergeht [168]. Zusätzlich fanden Mi *et al.*, dass die miR-128 in ALL-Zellen deutlich höher exprimiert ist als in AML-Zellen [169]. Kotani *et al.* publizierten im Jahr 2009 darüber hinaus eine erhöhte miR-128 Expression in MLL positiven ALL-Proben gegenüber Proben ohne MLL-Translokationen [170]. Die Autoren konnten zusätzlich zeigen, dass eine Überexpression der miR-128 in den Zelllinien RS4;11 und SEM zu einer stärkeren Sensitivität gegenüber Doxorubicin führt und beide Fusionsproteine (MLL-AF4 und AF4-MLL) durch die miR-128 gehemmt werden. Beide Zelllinien sprechen in gleichem Ausmaß auf die Überexpression und anschließende Behandlung mit Doxorubicin an. Es wird jedoch kein direkter Vergleich in der endogenen Expression der miR-128 gezeigt, so dass es nicht möglich ist, die hier präsentierten Unterschiede in den Zelllinien zu bestätigen [170]. Ein weiteres Zielgen der miR-128 ist das Protoonkogen BIM-1, das zu den Polycomb-group Proteinen gehört [171]. BIM-1 ist wesentlich an der Selbsterneuerung von Stammzellen beteiligt und spielt auch eine Rolle in der Leukämiegenese [172]. Weitere potenzielle Ziele der miR-128 sind das Zytokin CSF-1, die Signalmoleküle Deltex (Notch-Signalweg), DVL2 (Wnt-Signalweg) und Vangl (interagiert mit DVL2) sowie die Transkriptionsfaktoren FOXQ1, HOXA13, HOXB8, KLF4 (wirkt als p53 Repressor) und THAP11 (erhält die Pluripotenz in embryonalen Stammzellen). Darüber hinaus besitzt das Protein Yippee-like 3 (Ypel3, involviert in Proliferation und Apoptose in myeloiden Vorläuferzellen) eine miR-128 Bindesequenz.

Die miR-210 zeigt eine sehr geringe Expression in HSZ, B-Zellen und der Zelllinie MV4;11 (-2,1 – 2,6), eine schwache Expression in RS4;11 (-0,6) und eine starke Expression in SEM (+1,5). Sie liegt unabhängig von anderen Strukturen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11. Ihre Expression ist in Zellen nach Sauerstoffmangel deutlich höher und der Hypoxia-induced-factor 1 (HIF1) spielt eine entscheidende Rolle bei der Expressions-Regulation [173-174]. Sie ist häufig in Brustkrebs deletiert und ihre Expression stellt (gemeinsam mit dem

miRs 7, 128 und 516-3p) eine Signatur für Östrogen-Rezeptor-positiven, Lymphknoten-negativen Brustkrebs dar [167, 174]. Darüber hinaus korreliert ihre Expression invers mit dem Gesamt-Überleben sowie dem krankheitsfreiem Überleben in Brustkrebs [175]. Ihre Expression wird zusätzlich durch Zugabe von Hemin gehemmt und sie nimmt im Verlauf der Erythrozyten-Differenzierung ab [79]. In diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen zeigt sie eine verstärkte Expression im Vergleich zu gesunden Kontrollen, und sie ist in ALLs im Vergleich zu AMLs ebenfalls signifikant höhere exprimiert [169, 176]. Die miR-210 hemmt die proapoptotische Signalkaskade und führt somit zu einem besseren Überleben [173, 177]. Zu den validierten Zielen der miR-210 gehören der Transkriptionsfaktor E2F3, der Tyrosin-Kinase-Rezeptor-Ligand Ephrin A3 sowie der Myc-Antagonist MNT [174]. Bei der miR-210 konnten nur sehr wenige weitere, potenzielle Zielgene ermittelt werden. Darunter befinden sich die beiden Transkriptionsregulatoren SCRT1 und ZNF462 sowie das für die Bildung von Eisen-Komplex verantwortliche Protein ISCU.

Die miR-124 zeigt eine sehr starke Expression in der Zelllinie RS4;11 (+2,3), in allen anderen Proben ist sie jedoch nicht nachweisbar (-3,6 - -4,5). Sie liegt in drei voneinander unabhängigen Genloci, von denen sich zwei auf Chromosom 8 befinden (8p23 und 8q12), der dritte befindet sich auf Chromosom 20. Sowohl RS4;11 als auch MV4;11 weisen ein zusätzliches Chromosom 8 auf, jedoch zeigt nur RS4;11 eine starke miR-124 Expression, so dass zu vermuten ist, dass in erster Linie epigenetische Regulationsmechanismen zu einer Anschaltung des miR-124-Gens führen, welche dann (im Fall von RS4;11) von zwei zusätzlichen Genloci transkribiert werden kann. Die miR-124 nimmt eine entscheidende Rolle in der Neurogenese ein, die von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben wurde [164, 178-179]. Darüber hinaus zeigt sie in ALL-Proben eine Dysregulation, die auf einer epigenetischen Stilllegung aller drei Genloci beruht. Hierbei liegt sowohl eine verstärkte Methylierung der DNA selbst als auch eine repressende Modifikation der Histone vor [157, 180]. Dies könnte die Unterschiede zwischen RS4;11 und SEM erklären. Eine starke Hypermethylierung der Gene stellt einen schlechten Prognosefaktor für die ALL dar, sowohl in Bezug auf die Mortalität als auch das Rückfallfreie-Überleben. Bei AML-Patienten ist sie Teil der von Marcucci *et al.* postulierten Signatur und eine hohe Expression geht mit einer schlechten Prognose einher (s. 4.3) [168]. Als Zielgene wurden bisher das an der Chromatin-Struktur beteiligt Protein BAF53, die den Zellzyklus regulierende CDK6, der Glucokortikoid-Rezeptor sowie der Transkriptionsfaktor C/EBP α identifiziert [127, 180-182]. Zu den weiteren potenziellen Zielen zählen die Transkriptionsfaktoren E2F3, E2F5, die Zellzyklusregulatoren MDC1, PIM3, RAD17 sowie das Akt1-Substrat Akt1S1, welches im mTORC1-Komplex involviert ist. Darüber hinaus weisen die an der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen beteiligten Transkriptionsregulatoren LHX2 und LMO4 sowie die beiden zum NF κ B-Signalweg gehörenden Proteine ASCC2 und NKAP miR-124 Bindestellen

auf. Auch die beiden an der T-Zell-Immunantwort beteiligten Faktoren TFEB und TIA1 können potenziell durch die miR-124 reguliert werden.

Die miR-214 zeigt nur in der Zelllinie MV4;11 eine hohe Expression (+1,5), in den anderen Proben konnte nur eine geringe Expression detektiert werden. Sie liegt gemeinsam mit der miR-199a-2 intronisch im Gen DNMT3; die miR-199a zeigt ein vergleichbares Expressionsprofil in den untersuchten Zellen. Die miR-214 zeigt eine hohe Expression in Ovarialkarzinomen [183]. In mesodermalen Zellen wird ihre Expression durch den Transkriptionsfaktor TWIST1 reguliert [184]. In einem *in vivo* Modell stellten Mochos *et al.* einen Anstieg der miR-214 im Lungengewebe von Mäusen fest, die zuvor mit LPS-Aerosolen behandelt wurden [185]. Hieraus schlossen die Autoren auf eine Rolle der miR-214 in der angeborenen Immunantwort. Als Zielgen wurde bisher das Signalmolekül PTEN identifiziert, das einen negativen Regulator des PI3K-Akt-Signalwegs darstellt [183]. In den hier untersuchten Zelllinien zeigen SEM und RS4;11 eine starke PTEN-Expression, in MV4;11 liegt jedoch deutlich weniger Protein vor (persönliche Kommunikation mit Frau Dipl. Biol. Catrin Schult). Dies geht einher mit der hohen miR-214 Expression in MV4;11. Eine hohe miR-214 Expression korrelierte bei Yang *et al.* ebenfalls mit einer gesteigerten Aktivität von Akt. Dies konnte in den hier untersuchten Zelllinien nicht bestätigt werden. Ursächlich hierfür könnte unter anderem der negative Einfluss der miR-126 auf die Expression der p85 β und somit die Aktivität von Akt sein (s. oben). Darüber hinaus trägt die miR-214 zu einer Resistenz gegenüber Cisplatin bei [183]. Als zweites Zielgen wurde das in den Hedgehog-Signalweg involvierte Protein Dispatched-2 (DISP2) identifiziert [186]. Der Hedgehog-Signalweg spielt nur eine untergeordnete Rolle in der Regulation der Hämatopoese [187], dennoch dürften Dysregulationen eine Auswirkung auf das normale Verhalten der Zellen haben. Weitere potenzielle Zielgene sind die Signalmoleküle CRKL und GPR6, der Tumorsuppressor KLF10 sowie die Histon-Methyltransferase EZH1 und die Ubiquitin-Ligase RNF2. Aus hämatologischer/immunologischer Sicht sind insbesondere die möglichen Ziele CSF-1 (Monozyten/Makrophagen Differenzierung), PHC2 (negativer Regulator verschiedener HOX-Gene), Vascularin (Inhibitor des TGF β -Signalweges) und ZBTB20 (Transkriptionsfaktor in der Hämatopoese und Immunantwort) interessant.

Bisher wurden einige Studien veröffentlicht, die die miRNA-Expression mit verschiedenen zytogenetischen Veränderungen in Leukämien, auch MLL-Aberrationen, korrelieren [73, 76, 169]. Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie über die miRNA-Expression sowohl in ALL- als auch AML-Zellen mit einer t(4;11) Translokation im Vergleich zu gesunden Stammzellen und B-Zellen. Daher ist es nur schwer möglich, die hier vorgestellten Ergebnisse mit den bisher veröffentlichten Expressionsprofilen direkt zu vergleichen. Dennoch wurden diese Studien auf eventuelle Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Expression überprüft und dies bei der entsprechenden miRNA erwähnt. Darüber hinaus gibt es bis dato drei Studien, die funktionelle

Aussagen über die miRNA-Expression in MLL-aberranten Zellen treffen. Nakamura *et al.* untersuchten neben der Expression der reifen miRNAs auch die Expression beider Vorläufermoleküle und fanden, dass MLL-Fusionsproteine mit der Endonuklease Drosha interagieren, nicht jedoch endogenes MLL-Protein. Ein Ausschalten des Fusionsproteins MLL-AF4 führte zu einer Anreicherung spezifischer pri-miRNAs, woraus die Autoren schlossen, dass die Bindung von MLL-AF4 an Drosha die Spaltung einiger miRNAs fördert und so zu einer vermehrten Bildung der reifen miRNAs führt [77]. Die miR-196b liegt innerhalb eines Clusters zwischen den Genen HOXA9 und HOXA10, und HOX-Cluster zählen zu den stark durch die endogene MLL regulierten Genen. Auch die miR-196b wird so reguliert, eine Aberration im MLL-Gen korreliert hier mit einer Überexpression der miR-196b. Dies führt zu einer erhöhten Proliferation der Zellen, die durch eine Hemmung der miR-196b mittels ASOs inhibiert wird [188]. Die miR-196b zeigt in den hier vorgestellten Ergebnissen eine sehr geringe Expression in B-Zellen (-2, allerdings wurden nur zwei Replikate detektiert), eine schwache Expression in RS4;11 (-0,8) und eine mäßig bis starke Expression in MV4;11 und SEM (+0,5 bzw. +1,2). Die HSZ zeigen ebenfalls eine niedrige Expression, allerdings sind die Schwankungen hier sehr groß (-0,2 - -1,6), so dass keine Signifikanzen errechnet werden konnten. Die Rolle der miR-128 in MLL-positiven Leukämien wurde bereits weiter oben diskutiert [170]. Darüber hinaus zeigten Garzon *et al.*, dass die miR-204 die beiden in MLL-Leukämien häufig deregulierten Gene HOXA9 und MEIS1 negativ beeinflusst [98]. Diese miRNA konnte in der Mehrzahl der Microarray-Slides nicht detektiert werden, so dass keine Aussage zu ihrer Expression getroffen werden kann.

Insgesamt zeigen die in den Zelllinien stark exprimierten miRNAs häufig einen engen Zusammenhang mit nicht-hämatopoetischen Geweben. Die möglichen Einflüsse auf die Hämatopoese scheinen eher untergeordneter Rolle zu sein. Eine Dysregulierung dieser miRNAs im Vergleich zu den gesunden Zellen scheint somit eher eine Folge bzw. Reaktion auf die maligne Transformation zu sein als ein Auslöser hierfür. Darüber hinaus lassen sich die meisten Unterschiede in der miRNA Expression nicht durch chromosomale Aberrationen oder Mutationen erklären. So weist z.B. RS4;11 eine Inversion des Chromosoms 7q auf, auf dem sich die Gene der miRNAs 29ab befinden, die Expression beider miRNAs ist jedoch vergleichbar mit der Expression in SEM-Zellen. Gleiches gilt für die miR-150, die sich auf Chromosom 19 befindet und in allen drei Zelllinien eine ähnliche Expression zeigt, obwohl MV4;11 ein zusätzliches Chromosom 19 aufweist. SEM-Zellen zeigen einen Verlust des Chromosoms 13, auf dem sich das Gen der miR-18a befindet. Die Expression dieser miRNA ist zwar geringfügig niedriger als in RS4;11, jedoch nicht in einem Maß, wie man es bei dem Verlust eines Genlocus erwarten würde. Sowohl RS4;11 als auch MV4;11 besitzen ein zusätzliches Chromosom 8, auf dem sich zwei Genloci der miR-124 befinden. Aber während RS4;11 als einzige Zelllinie eine

sehr starke Expression aufweist, ist sie in MV4;11 extrem schwach. Einzig die Expression der miR-155 in der Zelllinie MV4;11 korreliert mit einer Deletion des Chromosoms 21. Das p53-Gen weist in der Zelllinie MV4;11 eine aktivierende Mutation auf, wodurch sich die hohe Expression der miR-34a in dieser Zelllinie erklären lässt. Die Unterschiede zwischen SEM und RS4;11 in der Expression dieser miRNA sind vermutlich auf Differenzen im epigenetischen Methylierungsmuster zwischen den Zelllinien zurück zu führen. Somit sind in den meisten Fällen transkriptionelle bzw. epigenetische Veränderungen der Auslöser für die beschriebenen Dysregulationen, nicht strukturelle oder sequentielle Modifikationen.

Zusammenfassend lässt sich folgendes Modell zur Rolle der miRNAs in Hämatopoese und Leukämiegenese entwerfen:

Die miRs 126 und 130a dürften aufgrund ihrer bisher bekannten sowie der noch möglichen Ziel-mRNAs eine wesentliche Rolle in der Aufrechterhaltung des unreifen Status der Stammzelle spielen und eine Ausdifferenzierung verhindern, so dass die Abschaltung ihrer Expression mit dem Beginn der Differenzierung einhergeht. Eine gesteigerte, dysregulierte Expression trüge somit zur Entstehung von Leukämien mit einem unreifen Zellprofil bei. Dies wird auch durch die leicht stärkere Expression in jeweils einer Zelllinie unterstützt. Die miR-451 (9.1) hingegen scheint aufgrund ihrer Zielgene eher direkt an der Reifung mitzuwirken; die höchste Expression in Stammzellen kann durch die „Theorie des vermischten Anfangs“ erklärt werden, die die Expression vieler, für verschiedene Zelltypen spezifische Faktoren auf einem geringen Level in unreifen Stammzellen beschreibt. Die vermehrte Expression der einen und Reduzierung anderer Faktoren führt schließlich zur Ausdifferenzierung [189]. Diese für mRNAs postulierte Hypothese wird von Nagata *et al.* [190] auch für miRNAs vorgeschlagen und durch die hier beschriebenen Ergebnissen gestützt.

Die miR-29 Familie spielt ubiquitär eine vielfältige Rolle, indem sie zur Regulierung verschiedener Signalwege beiträgt, aber auch auf epigenetischer Ebene die Genexpression beeinflusst. Sie scheint jedoch auch spezifische immunologische Funktionen zu übernehmen, wodurch die Expression lediglich in reifen B-Zellen erklärt wird – sowohl die Stammzellen als auch die Zelllinien weisen einen zu geringen Differenzierungsgrad auf, um die miR-29 zu exprimieren. Im Gegensatz dazu ist die miR-150 deutlich spezifischer an der Hämatopoese und weniger an immunologischen Funktionen beteiligt. Jedoch spielt sie eine wichtige Rolle in der Umwandlung von naiven zu Antigen aktivierten B- und T-Zellen.

Von den hier diskutierten miRNAs, die eine hohe Expression in mindestens einer der Zelllinien zeigen, nicht jedoch in den gesunden Kontrollen, scheint keine hoch spezifisch für eine Translokation t(4;11)(q21;q23) zu sein. In den meisten Fällen wurden sie bereits in einem allgemeinem Zusammenhang mit akuten Leukämien beschrieben. Die miRNA 193-5p (9.1) wurde zwar von Garzon *et al.* als spezifisch für die Translokation 11q23 in AML-Patienten

beschrieben, in der vorliegenden Arbeit zeigten aber nur die ALL-Zelllinien eine hohe Expression [73]. Die Ursache hierfür ist unklar. Eine Dysregulation der anderen hier beschriebenen miRNAs dürfte zwar zum Prozess der Leukämiegenese beitragen, für diesen aber nicht zwingend notwendig sein, sondern (wie schon erwähnt) eine Folge dieser Transformation. Dies erklärt die teilweise großen Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien.

Es konnten keine miRNAs identifiziert werden, die in beiden gesunden Zellpopulationen eine hohe Expression zeigen. Alle hier als „Leukämie-spezifisch“ diskutierten miRNAs zeigen eine höhere Expression in den Zelllinien als in den gesunden Kontrollen. Es dürfte allgemein für die Dysregulationen von miRNAs gelten, dass eine Überexpression umfangreichere Auswirkungen auf das Proteom hat als eine zu niedrige Expression. So könnte die Entstehung der Myeloproliferation bei einer Überexpression der miR-155 dadurch erklärt werden, dass bei einer starken Expression der miRNA auch schwächere miRNA-mRNA Bindungen bestehen bleiben und so Faktoren, die unter physiologischen Konditionen nicht durch die miRNA reguliert werden (wie z.B. der Transkriptionsfaktor PU.1), beeinflusst werden.

Als besonders interessant für weitere Untersuchungen sind die miRNAs 34 und 128 anzusehen. Die miR-34 stellt aufgrund ihrer komplexen Regulation durch das p53 Netzwerk und dessen Auswirkungen auf die Zelle sowie ihrer potenziellen Zielgene einen interessanten therapeutischen Ansatz dar. Die miRNA-128 zeigt durch die Regulation der Fusionsproteine MLL-AF4 und AF4-MLL einen möglichen, attraktiven Ansatzpunkt, um die Auswirkungen dieser Translokation besser zu verstehen und zu modulieren.

Abschließend lässt sich festhalten, dass das hier vorgestellte Expressionsprofil einen tieferen Einblick in die Expression von miRNAs in akuten Leukämien gibt. Mögliche Auswirkungen der miRNA-Dysregulation benötigen jedoch ausführlichere, funktionelle Untersuchungen, um ein detaillierteres Bild zu erhalten.

4.2 Expression der miR-142 und miR-181a in hämatopoetischen Zellen

Im zweiten Teil der Promotionsarbeit wurde die Expression der miR-142 und der miR-181a in verschiedenen hämatologischen Zellen mittels qPCR untersucht. Hierbei wurden elf Zelllinien, vier gesunde Zellpopulationen, 29 AML und sieben ALL *de novo* Proben analysiert. Sowohl die Zelllinien als auch die *de novo* Patienten-Proben wiesen unterschiedliche morphologische, zytogenetische und molekularbiologische Faktoren auf, so dass die Expression auf eine mögliche Korrelation mit diesen Parametern hin untersucht wurde.

Die microRNA 142 spielt eine entscheidende Rolle bei der Hämatopoese und wurde von Landgraf *et al.* als eine von fünf für Blutzellen hochspezifische miRNAs identifiziert [34].

Die miR-142 konnte in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden, auch in HSZ. Das ermittelte Expressionsprofil, welches in reifen Zellen eine stärkere Expression als in unreifen zeigt und in myeloischen stärker ist als in lymphatischen Zellen, stimmt mit den bisher veröffentlichten Studien überein [191-192]. Beide zitieren Studien verwenden unterschiedliche Methoden zur Bestimmung der miRNA-Expression (Northern Blot bzw. qPCR ohne Calibrator), dennoch zeigen beide Studien von den hier untersuchten Zellen in B-Zellen die schwächste miR-142 Expression, gefolgt von Monozyten, und die höchste in Granulozyten.

Über die Regulation der miR-142 Transkription ist bisher wenig bekannt. Jedoch konnten Yuan *et al.* zeigen, dass der Transkriptionsregulator LMO2 (LIM domain only protein 2) eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Transkription spielt [193]. Die Bindung des miR-142 Promotors durch LMO2 und seine Cofaktoren führt zu einer verminderten miRNA-Expression. LMO2 ist ein 16 kDa großes Protein mit zwei LIM-Domänen, die ein Cystein reiches, zwei Zinkfingern bildendes DNA-binde Motiv darstellen. Zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren (LDB1, GATA1, TAL1 und E47) spielt es eine wesentliche Rolle in der Hämatopoese, vor allem in der Erythropoese [194-195]. Interessanterweise konnten Felli *et al.* im Jahr 2009 zeigen, dass LMO2 ein direktes Zielgen der microRNA 223 ist und eine verstärkte miR-223 Expression zu einem verminderten Proteinlevel von LMO2 führt [196]. Die miR-223 zählt ebenfalls zu den hämatopoetisch spezifischen miRNAs und spielt eine maßgebliche Rolle in der Granulopoese [197], wobei sie in reifen Granulozyten sehr stark exprimiert wird. Da LMO2 die miR-142 negativ reguliert, aber selber negativ durch die miR-223 beeinflusst wird, ist es konsequent, dass Granulozyten, die von den untersuchten Zellen laut Studien die höchste miR-223 Expression zeigen, auch die höchste Expression der miR-142 aufweisen. Allerdings muss es noch weitere Regulationsmechanismen für die Expression der miR-142 geben, da die miR-223 in lymphatischen Zellen nur sehr schwach bis gar nicht exprimiert wird [34].

Die Regulation der miRNA-Expression kann wie bei mRNAs neben der direkten Regulation der Transkription auch posttranskriptional erfolgen. So wurde von Yang *et al.* gezeigt, dass bestimmte Deaminasen pre-miRNA-Transkripte editieren und so ihre Prozessierung durch Drosha beeinflussen [9]. Durch die Umwandlung von Adenosin in Inosin durch die Deaminasen ADAR-1 p110 und ADAR-2 wird die Spaltung der pre-miR-142 verhindert, nicht jedoch durch die ADAR-1 p150 Isoform. Die pre-miRNA wird, sofern sie nicht prozessiert wird, durch die Ribonuklease Tudor-SN, einem Bestandteil des RISC, degradiert, was jedoch ebenfalls die A → I Editierung voraussetzt.

Neilson *et al.* haben die Expression der miR-142 in unterschiedlichen Stadien der T-Zell-Differenzierung untersucht. So nimmt die Expression im Verlauf von doppelt negativen (DN, CD4-/CD8-) Zellen (DN1) zunächst ab und erreicht im Stadium DN4 den geringsten Wert, um in den stärker differenzierten Zellen wieder anzusteigen. Die höchste Expression zeigen CD4+ Zellen, CD8+ Zellen exprimieren deutlich weniger miR-142, jedoch ebenfalls mehr als die Vorläuferzellen [39]. Zusätzlich zeigte diese Studie eine Abnahme der miR-142 Expression in CD8+ Effektorzellen im Vergleich zu naiven CD8+ Zellen, die in Gedächtniszellen wieder umgekehrt wird.

Einen weiteren Hinweis auf eine entscheidende Rolle bei der T-Zell-Funktion lieferten Sauer *et al.* 2008, die die Expression der miR-142 in Tregs untersuchten [198]. Sie konnten zeigen, dass naive T-Zellen ein deutlich höheres Level an miR-142 exprimieren als Antigen aktivierte Zellen, die Expression durch eine weitere Differenzierung zu Tregs jedoch deutlich abnimmt. Auch die Behandlung mit dem Treg-Marker FOXP3 (ein Transkriptionsfaktor) führte zu einer Abnahme der miR-142 Expression. Huang *et al.* konnten darüber hinaus zeigen, dass eine Hemmung von FOXP3 durch siRNAs zu einer Zunahme der miR-142 Expression führt [199]. Zusätzlich wurde in dieser Studie die mRNA der Adenylatzyklase 9 (AC9) als Ziel der miR-142 identifiziert. Adenylatzyklasen bilden aus ATP zyklisches AMP (cAMP), das ein wichtiges sekundäres Signalmolekül darstellt. Ein niedriger intrazellulärer cAMP-Spiegel ist für normale CD4+ T-Zellen wichtig für ihre Aktivierung, während Tregs einen hohen cAMP-Spiegel aufweisen. Durch Gap Junctions können Tregs cAMP an CD4+ T-Zellen übertragen und so deren Funktion unterdrücken. Durch die starke miR-142 Expression in normalen CD4+ Zellen wird die Bildung von cAMP durch die AC9 verhindert und so der cAMP-Spiegel niedrig gehalten. Wandelt sich die Zelle nun in eine Treg um und beginnt die Expression von FOXP3, so nimmt die miR-142 ab und gleichzeitig die AC9 zu, was konsequent zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels führt.

Die Behandlung mit LPS führt in der Lunge von Mäusen zu einer Zunahme der miR-142 Expression, die jedoch durch eine Behandlung mit Dexamethason nicht beeinflusst wird. Auch eine Gabe von Dexamethason allein beeinflusst die miRNA Expression nicht [185].

Auch wenn diese ersten Ergebnisse eine Rolle der miR-142 für die Regulierung der Immunantwort suggerieren, sind bisher keine eindeutigen Studien veröffentlicht, die z.B. eine Dysregulierung der miR-142 in Autoimmunerkrankungen oder im Verlauf einer Organtransplantation beschreiben. Über die weitere Rolle der miR-142 in der B-Zell-Reifung oder Funktion ist nichts bekannt.

Die untersuchten Zelllinien zeigen ein uneinheitliches Bild in der miR-142 Expression, aus dem sich kein Zusammenhang zwischen Subtyp und/oder Reifungsgrad erkennen lässt (Abb. 9). Betrachtet man jedoch die einzelnen Gruppen getrennt, so lassen sich einige mögliche Zusammenhänge identifizieren.

Von den zwei untersuchten T-ALL Zelllinien zeigt MOLT-4 eine sehr starke miR-142 Expression, Jurkat eine deutlich schwächere. Diese geringere Expression in Jurkat könnte durch eine Deletion von Chromosom 17 in Jurkat verursacht werden, da nur ein Genlocus zur Transkription zur Verfügung steht. Die Expression beträgt in Jurkat jedoch mehr als das 0,5-fache der Expression in MOLT-4, was auf eine eventuelle Überexpression des noch vorhandenen *miR-142* Gens hinweist, um den Verlust des einen Chromosoms auszugleichen. Bei den untersuchten ALL-Patienten zeigen die drei T-Zell-Proben die höchste miR-142 Expression. Patient 31 zeigt bei einer 4,6-fach höheren Expression als HSZ gleichzeitig einen Anteil von 81% CD4+ Zellen. Patient 32 zeigt bei einer 9,6-fachen Expression einen Anteil von 94% CD4+ Zellen und Patient 35 eine Expression von 11,2 und 98% CD4+ Zellen. MOLT-4 ist stark CD4 positiv, Jurkat auch hier deutlich schwächer positiv. Allerdings ist die Fallzahl zu gering, um eine signifikante Korrelation der miRNA-Expression mit dem Anteil an CD4 positiven Zellen ermitteln zu können. Die hohe miR-142 Expression könnte an einer Dysregulierung des Transkriptionsfaktors LMO2 liegen, die in 60 % der T-ALLs auftritt [50]. Eine höhere Fallzahl sowie eine gleichzeitige Untersuchung der LMO2-Expression sind jedoch nötig, um diesen Zusammenhang zu bestätigen.

Die drei B-ALL-Zelllinien sind vom Subtyp pro-B-ALL. REH weist eine Translokation der Chromosomen 12 und 21 auf, die zu einem Fusionsprotein aus den beiden Transkriptionsfaktoren TEL und AML1 führt. Diese Translokation tritt in ~25% der pro-B-ALLs auf. SEM und RS4;11 hingegen zeigen eine Fusion der Chromosomen 4 und 11, bei dem es zu einer Aberration der MLL-Methyltransferase kommt. Es wurde gezeigt, dass die MLL an den Promotor des *miR-142*-Gens bindet und durch eine Methylierung am Lysin 4 des Histons 3 eine Aktivierung der Chromatinstruktur bewirkt [32]. Sowohl RS4;11 als auch SEM weisen eine reduzierte miR-142 Expression im Vergleich zu REH auf (um das 2,5-fache). Dies ist möglicherweise auf eine veränderte Aktivität der MLL im mutierten Zustand zurück zu führen. Die einzige Studie, die die miRNA-Expression in ALL-Patienten untersucht und die Unterschiede zwischen MLL-mutierten und nicht MLL-mutierten Proben analysiert hat, kommt

zu dem Ergebnis, dass sowohl bei MLL-mutierten als auch MLL-unmutierten Patienten die miR-142 höher exprimiert wird als in gesundem Knochenmark, es jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden ALL-Gruppen gibt. Allerdings ist auch hier die miR-142 Expression mit mutiertem MLL niedriger als bei den MLL unmutierten ALLs [200]. Die B-ALL Patienten zeigen ebenfalls ein unterschiedliches Expressionsmuster, jedoch ist die Datenlage aus der Literatur sowie die Fallzahl der vorliegenden Arbeit für eine weitere Analyse zu gering. Die B-ALL Probe mit einer t(4;11) weist jedoch eine eher hohe miR-142 Expression auf.

Die drei Zelllinien DogKit, DoGum und GumBus stellen hoch-maligne non-Hodgkin-Lymphome unterschiedlicher Klassifizierungen dar [201-202]. Während es sich bei GumBus und DogKit um Burkitt-Lymphome handelt, stellt DoGum ein zentroblastisches NHL dar. DoGum ist die einzige Zelllinie mit einer gegenüber HSZ nicht erhöhten miR-142 Expression, wohingegen sowohl GumBus (2,8-fach) als auch DogKit (4,5-fach) eine deutlich höhere Expression zeigen. Es sind bisher keine Daten über die miR-142 Expression in verschiedenen NHLs veröffentlicht worden. DogKit zeigt jedoch eine Duplikation des Chromosoms 17, wodurch die stark erhöhte miR-142 Expression erklärt werden könnte, bei GumBus liegt die Expression auf dem Niveau von gesunden B-Zellen.

Bei den AML-Zelllinien zeigt sich ebenfalls ein sehr heterogenes Bild. Auf den ersten Blick könnte man eine leichte Abnahme der miR-142 Expression in Zusammenhang mit dem Differenzierungsstadium der Zellen vermuten, da HL60 als FAB Subtyp M2 mit 3,5 die höchste Expression aufweist, gefolgt von NB4 mit 3,2 als M3 und MV4;11 als M5b Subtyp mit 3,1. Bezieht man jedoch die zytogenetischen Aberrationen der Zelllinien mit in die Betrachtung, so wird das Bild deutlich komplexer. Während NB4 ein zusätzliches Chromosom 17 besitzt und somit einen dritten *miR-142* Genlokus, zeigt HL60 bei einem hypotetraploiden Chromosomensatz den Verlust von gleich zwei Chromosomen 17, so dass in der Summe nur zwei Genloki der *mir-142* vorhanden sind. Neben der alleinigen Anzahl an Genen muss also auch eine unterschiedliche Regulation der Expression vorliegen. MV4;11 hingegen weist wie schon SEM und RS4;11 eine Translokation (4;11)(q21;q23) auf. Während die Datenlage für ALLs mit einer MLL-Translokation zur Zeit noch sehr limitiert ist, wurden inzwischen mehrere Studien veröffentlicht, die sich mit der veränderten miRNA-Expression bei bestimmten zytogenetischen Aberrationen in AMLs beschäftigen. Jedoch zeigt keine der Publikationen einen Unterschied in der miR-142 Expression zwischen MLL-mutierten und MLL-nicht-mutierten Proben [76-77]. Auch die eine Patientenprobe mit einer t(4;11) zeigt keine außergewöhnliche miR-142 Expression.

Darüber hinaus konnten in den meisten Studien zur miRNA-Expression in AML keine Unterschiede in der miR-142 Expression im Vergleich zu gesunden Zellen festgestellt werden [73, 76]. Auch konnte kein Zusammenhang der miR-142 mit den unterschiedlichen AML-

Subtypen oder bestimmten zytogenetischen Aberrationen ermittelt werden.

Eine Publikation von Garzon *et al.* zeigt eine höhere Expression der miR-142 in AML Patienten, die eine Mutation des Nucleophosmin 1 (NPM1) aufweisen. Dieses Protein ist an vielen zellulären Prozessen wie dem Transport und Versammlung ribosomaler Proteine sowie der Kontrolle des Tumorsuppressors ARF1 beteiligt [98]. Mutationen in seinem Gen treten in 50-60 % der AMLs mit normalem Karyotyp auf [203]. Von den hier untersuchten Patienten, bei denen eine NPM1-Mutationsanalyse durchgeführt wurde, weisen 47 % (9/19) eine solche Mutation auf, allerdings konnte kein Zusammenhang mit der miR-142 Expression erkannt werden (Abb. 16 C). Aufgrund der geringen Fallzahl in der vorliegenden Arbeit ist die Aussagekraft dieser Analyse zwar begrenzt, dennoch sollte eine Tendenz erkennbar sein. Diese bestätigt nicht die von Garzon *et al.* beschriebene höhere Expression bei Vorliegen einer NPM1-Mutation.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Microarrays zeigten ein etwas anderes Expressionsprofil als die quantitative PCR. Dies dürfte im Wesentlichen an der unterschiedlichen Sensitivität der Techniken liegen. Darüber hinaus könnte auch hier ein Unterschied in den detektierten Sequenzen liegen, da die Arrays neben den Referenz-Sequenzen möglicherweise auch IsomiRs detektiert könnten. Es konnten leider keine Angaben der Firma Exiqon zur Länge der verwendeten Oligonukleotide in den Microarrays gefunden werden, um dies zu bestätigen oder zu widerlegen.

Im Gegensatz zur miR-142 zählt die miR-181a nicht zu den für hämatopoetische Zellen spezifischen miRNAs, jedoch konnte auch ihr eine wesentliche Rollen in der Hämatopoese zugeschrieben werden, ebenso wie eine Dysregulierung einen Einfluss auf die Leukämiegenese zu haben scheint. Analog zur miR-142 wurde auch die Expression der miR-181a in verschiedenen leukämischen Zelllinien, gesunden B-Zellen, Monozyten, Granulozyten und HSZ sowie in 29 AML und acht ALL-Patienten untersucht.

Die Expression der miR-181a konnte in allen untersuchten Proben ermittelt werden. Im Gegensatz zur miR-142 ist die Expression in den reifen Zellen jedoch geringer als in HSZ. Dieses Ergebnis wird durch die bisherigen Veröffentlichungen gestützt [191-192]. Während in der vorliegenden Dissertation alle untersuchten reifen Zellen ein sehr ähnliches Expressionsniveau zeigen, wurde von den beiden oben erwähnten Veröffentlichungen die höchste Expression in Monozyten beschrieben, gefolgt von Granulozyten und B-Zellen. Allerdings sind die Unterschiede wie auch in der vorliegenden Arbeit sehr gering, so dass diese Abweichung durch die verschiedenen Techniken der Studien erklärt werden können.

Georgantas *et al.* zeigten, dass in HSZ aus dem Knochenmark die miR-181a Expression höher ist als in HSZ, die nach ihrer Mobilisierung aus dem peripheren Blut gewonnen wurden.

Darüber hinaus zeigt diese Studie, dass die miR-181 Familie die 3'UTR der CXCR4-mRNA beeinflusst, ein direkter Nachweis auf das Proteinlevel erfolgte jedoch nicht. [204]. CXCR4 ist ein Chemokinrezeptor und spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Ruhezustandes sowie der Wanderung von HSZ, so dass eine Fehlregulierung durch eine dysregulierte miR-181a Expression zu einem veränderten Verhalten der Stammzelle führen dürfte. Während diese Studie ebenso wie die vorliegende Arbeit ein Rolle der miR-181a in der Erhaltung des Stammzellzustandes impliziert, konnten Choong *et al.* eine Zunahme der miR-181a Expression während der Erythropoese zeigen [205]. Dies wurde von Zhan *et al.* und Masaki *et al.* jedoch nicht bestätigt [206, 207].

Ein weiteres Zielgen identifizierten Naguibneva *et al.* in differenzieren Myoblasten mit dem Homeobox-Gen HOXA11 [208]. HOXA11 spielt eine wichtige Rolle in der Hämatopoese, in dem es z.B. die DNA-Bindung von MEIS1b stabilisiert, einem wichtigen Transkriptionsfaktor für die Hämatopoese, und in die Entstehung von Leukämien involviert ist [209]. Zusätzlich ist HOXA11 in T-ALLs mit einer Inversion des Chromosoms 7 [inv(7)(p15q34)] dysreguliert [210]. Eine mögliche Veränderung in der miR-181a Expression könnte ebenfalls zu einer Veränderung in der HOXA11 Expression führen und so zur Leukämiegenese beitragen.

Zu der Transkriptionsregulation der miR-181a sind bisher nur sehr wenige Daten veröffentlicht. Einzig eine Publikation von Guimeras-Sternberg *et al.* aus dem Jahr 2006 zeigt, dass in Megakaryoblasten die Expression der miR-181a während der Differenzierung in einem Calcium-abhängigen Weg abnimmt und diese Abnahme wesentlich für die Ausreifung ist. Gleichzeitig mit der Abnahme der miR-181a erfolgt eine vermehrte Bindung des Transkriptionsfaktors GATA-1 an die DNA, so dass eine Regulation der miR-181a Expression durch eine Beteiligung von GATA-1 unwahrscheinlich erscheint [211]. Interessanterweise zeigt die Patientenprobe 19, die von einem Patienten mit akuter Megakaryoblasten Leukämie stammt, mit 3,3 eine hohe miR-181a Expression. Dies passt zu der Beobachtung, dass unreife Megakaryoblasten eine hohe miR-181a Expression zeigen. Über weitere Regulationsmechanismen der Expression, die durch eine Fehlregulierung zur Entstehung von Leukämien beitragen, kann momentan nur spekuliert werden. Die Behandlung von ALL-Zelllinien mit dem Glucokortikoid Dexamethason zeigt nach sechs Stunden einen leichten Anstieg der miR-181a Expression, der jedoch nach 24 Stunden wieder abgesunken gegangen ist [212]. Glucokortikoide führen zu einer Modulation des Calciumhaushaltes in Lymphozyten [213], so dass die oben beschriebene Veränderung der miR-181a Expression während der Megakaryoblastenreifung durch Calcium auch eine Rolle bei den Veränderungen der miR-181a Expression durch Dexamethasonbehandlung erklären könnte.

Ebenfalls als Zielgen wurde der Tumorsuppressor p27^{Kip} identifiziert [214]. p27^{Kip} reguliert den Zellzyklus am G₁/G₀-Übergang und greift in die Regulation der Apoptose ein. Die Autoren konnten zeigen, dass während der TPA-induzierten Differenzierung von HL60 Zellen die

miR-181a abnimmt, während die Expression von p27^{Kip} zunimmt. In THP1-Zellen (AML M5) führte eine Überexpression der miR-181a zu einer Abnahme von p27^{Kip}.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelllinien zeigen ein uneinheitliches Bild in der miR-181a Expression. Eine Korrelation zwischen Zelltyp und Expression konnte nicht beobachtet werden. Von den beiden T-ALL-Zelllinien Jurkat und MOLT-4 zeigt Jurkat eine Expression auf Stammzellniveau, wohingegen MOLT-4 mit einer 3,7-fach höheren Expression den höchsten Wert aller untersuchten Zelllinien aufweist. Die drei Vorläufer-B-ALL-Zelllinien zeigen alle ein höheres Expressionslevel als Stammzellen, wobei REH mit einer 2,4-fachen Expression am höchsten liegt. Dies stimmt mit den bisher publizierten Daten von Schotte *et al.* überein, die in pädiatrischen ALL-Patienten eine Hochregulierung der miR-181a im Vergleich zu gesunden HSZ zeigen konnten [200]. Die beiden Lymphomzelllinien DoGum und GumBus zeigen eine z.T. deutlich niedrigere miR-181a Expression als Stammzellen, was daraufhin deutet, dass sie sich in ihrem Reifungsgrad näher an reifen B-Zellen als an unreifen Stammzellen befinden. Die Zelllinie DogKit zeigt die zweithöchste miR-181a Expression von den untersuchten Zelllinien. DogKit weist eine Duplikation des Chromosoms 1 auf, wodurch ein dritter Genlocus der miR-181a vorhanden ist. Allerdings müssen noch weitere, regulatorische Mechanismen eine Rolle spielen, da die hohe Expression nur durch einen zusätzlichen Genlocus nicht erklärt werden kann.

Bei den AML-Zelllinien weist lediglich NB4 eine höhere miR-181a Expression als HSZ auf, HL60 und MV4;11 zeigen eine z.T. deutlich geringere Expression. Dieses entspricht nicht den Aussagen von Debernardi *et al.* [41], die in unreifen im Vergleich zu reifen Subtypen eine höhere Expression festgestellt haben, da HL60 mit dem Subtyp FAB M2 die unreifste Zelllinie darstellt. Auch bei dem *de novo* Material konnte keine solche Korrelation festgestellt werden (Abb. 16 A). Die Eingrenzung auf Patienten mit einem normalen Karyotyp wie in der erwähnten Studie zeigt ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen Subtyp und miR-181a Expression. Interessanterweise publizierten Isken *et al.* 2008 eine signifikant höhere Expression der miR-181b in den FAB Subtypen M4 und M5 im Vergleich zu den anderen Subtypen, wohingegen die miR-181a in diesen beiden Subtypen eine nicht signifikant geringere Expression zeigt [215]. Dieses Ergebnis ist mit den hier vorgestellten Daten vergleichbar. Diese ungleiche Expression der miR-181a und 181b erscheint ungewöhnlich, da beide von einem gemeinsamen Cluster transkribiert werden. In pädiatrischen ALL-Patienten weisen sie ein gemeinsames Expressionsprofil auf [200]. Allerdings gibt es auch mehrere Studien, die eine unterschiedliche Expression der miR-181a und miR-181b zeigen. Diese werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

Die bisher veröffentlichten Studien zur globalen miRNA-Expression in AML Patienten zeigen wie auch bei der miR-142 eine unterschiedliche Expression der miR-181a. Während in einigen Publikationen keine Unterschiede zwischen z.B. ALL und AML [169] oder in verschiedenen AML-Klassen mit definierten zytogenetischen Veränderungen [216] in der

miR-181a Expression festgestellt wurden, zeigten andere Studien eine veränderte Expression in bestimmten Subtypen wie z.B. AML-Patienten mit zytogenetisch normalem Karyotyp oder AMLs, welche aus einem Myelodysplastischem Syndrom (MDS) hervor gingen.

So zeigt die Studie von Garzon *et al.* aus dem Jahr 2008, dass die miR-181a als einzige der untersuchten miRNAs eine signifikant niedrigere Expression in Patienten zeigt, bei welchen bereits vor der AML ein MDS diagnostiziert wurde, als in *de novo* AML-Patienten [73]. Pons *et al.* konnten zeigen, dass die Expression der miR-181a im Knochenmark von MDS-Patienten höher ist als in gesunden Kontrollen, nicht jedoch in den peripheren Blutzellen, und die miR-181a Expression im Verlauf der Leukämiegenese von den gesunden Kontrollen über MDS bis hin zur AML post-MDS kontinuierlich zunimmt [71]. Die höhere Expression im Knochenmark gegenüber den peripheren Zellen stimmt mit dem gängigen Expressionsprofil mit einer höheren Expression in unreifen HSZ vs. reifen Zellen überein; zumal die Studie eine höhere miR-142 Expression in den peripheren Zellen gegenüber den Knochenmarkszellen zeigt. Allerdings ist auch die miR-142 in den MCs von MDS-Patienten höher als in den gesunden Kontrollen [71]. Von den hier untersuchten 29 AML-Patienten weisen sechs Patienten (21 %) eine vorherige MDS-Diagnose auf. Auch hier ist eine niedrigere Expression in den Patienten, bei welchen im Vorfeld der AML ein MDS diagnostiziert wurde, zu beobachten (Abb. 16 B), der statistische Vergleich mittels t-Test ergab einen p-Wert von 0,07, so dass die Differenz zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant ist. Dennoch zeigt sich eine Trend, der in einer größeren Kohorte deutlicher ausfallen dürfte und durch die Publikation von Garzon *et al.* gestützt wird [73].

Die Studie von Marcucci *et al.* aus dem Jahr 2008 zeigt eine Korrelation der Expression der miR-181 Familie mit dem Auftreten von Mutationen im CEBPA-Gen (CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha) bei Patienten mit einem unauffälligem Karyotyp, aber hohem molekularem Risiko [168]. Das CEBPA-Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor der Leuzin-Zipper-Familie mit essentieller Bedeutung in der myeloischen Differenzierung [217]. Mutationen in diesem Gen treten in 13–19 % der AML-Fälle mit zytogenetisch normalen Karyotyp auf [218]. Die Marcucci *et al.* identifizierten mittels Microarrays 15 Sonden, die in Patienten mit einer Mutation im CEBPA-Gen hoch reguliert waren sowie zwei niedriger exprimierte Sonden. Die verwendeten Sonden weisen eine deutlich längere Sequenz als die reifen miRNAs auf, und pro miRNA wurden mehrere Sonden mit unterschiedlichen Sequenzen in den zusätzlichen Nukleotiden verwendet. Von den 15 hochregulierten Sonden detektieren acht Mitglieder der miR-181-Familie. Dies deutet darauf hin, dass nicht nur die Referenz-Sequenz der mirBASE in Zellen vorkommt, sondern eben mehrere Formen der reifen miRNA vorliegen können, wie schon von Kuchenbauer *et al.* beschrieben [16].

Auch bei der miR-181a zeigten die Microarrays zum Teil ein anders Expressionsprofil als die PCR, was wie bei der miR-142 an den unterschiedlichen Sensitivitäten der verwendeten Techniken liegen dürfte.

4.3 Prognostische Bedeutung der miRNA-Expression

Die Therapie akuter Leukämien ist in den letzten Jahren zunehmend Risiko-adaptierter geworden. So werden basierend auf der durchflusszytometrischen und zytogenetischen Diagnose Therapieverfahren ausgewählt. Dennoch ist die Suche nach weiteren biologischen Markern erforderlich, um eine differenziertere Diagnosestellung treffen zu können und so eine individuell angepasste Therapiestrategie anwenden zu können.

Bisherige Studien konnten zeigen, dass mittels miRNA-Expressionsprofil die Aufschlüsselung von Proben nach Krebsart bzw. Gewebeansprung möglich ist [219]. Ein besonderer Vorteil der miRNA-Profile liegt in der Möglichkeit, auch Proben von wenig differenzierten Tumoren zu klassifizieren, was mittels mRNA-Expressionsprofil häufig nicht möglich ist. Ebenso kann das Ursprungsgewebe von Metastasen durch die Expression von 48 miRNAs mit 90 prozentiger Sicherheit festgestellt werden [220]. Darüber hinaus haben Tanaka *et al.* festgestellt, dass im Plasma von Patienten mit akuter Leukämie die miR-92a eine drastisch verminderte Expression im Vergleich zu Kontrollen zeigt [221]. Gleichzeitig konnte eine hohe miR-92a Expression in AML- und ALL-Blasten detektiert werden, nicht jedoch in gesunden Blasten. In den Microarray-Untersuchungen dieser Arbeit zeigt die miR-92a lediglich in MV4;11 sowie in HSZ eine geringfügig höhere Expression als in den anderen Zellpopulationen. Zusätzlich zu der Verwendung als diagnostische Marker wird zunehmend versucht, eine mögliche prognostische Bedeutung der miRNA-Expression zu ermitteln. So konnte mit verschiedenen miRNAs bei unterschiedlichen Tumorerkrankungen eine Prognosestelle für das krankheitsfreie bzw. Gesamtüberleben ermittelt werden. Eine hohe miR-21 Expression korreliert in Kolonkarzinomen mit einer schlechten Prognose und einem schlechten Ansprechen auf die Therapie [222]. Bei chronisch lymphatischen B-Zell Leukämien (B-CLL) zeigt die Expression der miRs-29c und 223 hohes prognostisches Potenzial, da die Unterteilung in Gruppen mit hoher bzw. niedriger Expression eine sehr genaue Vorhersage für das Gesamtüberleben bzw. das behandlungsfreie Überleben ermöglicht [96]. Die miR-29c zeigt in den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Microarray-Daten eine starke Expression nur in B-Zellen, in den andern untersuchten Zellpopulationen ist sie lediglich schwach exprimiert, auch in den Vorläufer-B-ALL-Zelllinien (siehe 4.1). Somit scheint diese Dysregulation in akuten Leukämien selten bis gar nicht aufzutreten und dementsprechend dürfte eine Übertragung dieses Modells auf B-ALL Erkrankungen nicht möglich sein. Die miR-223 wurde nicht in allen Replikaten detektiert, so dass keine Aussage über die Expression möglich ist. Bei AML-Patienten korreliert die Expression der miRs-191 und 199a ebenfalls mit dem Gesamtüberleben bzw. dem rückfallfreiem Überleben. Die Autoren entwickelten ein Prognosemodell, in dem sie das prognostische Potenzial der konventionellen Zytogenetik mit dem neu identifizierten

Potenzial der beiden miRNAs in einer multivariaten Analyse kombinierten. So entstand ein neuartiges Modell zur Prognosestellung, das konventionelle Methoden mit den aktuellen Forschungsergebnissen der miRNA Expression verbindet [73]. Die miR-191 wurde in den in dieser Arbeit durchgeführten Microarrays ebenfalls als differenziell exprimiert (s. 4.1). Die miR-199a-5p zeigt ebenfalls eine niedrigere Expression in den gesunden Zellen, aber auch in den Vorläufer-B-Zelllinien, jedoch eine hohe in der AML-Zelllinie. Der Gegenstrang, die miR-199-3p, zeigt auch eine sehr geringe Expression in HSZ und B-Zellen, eine schwache Expression in RS4;11 und SEM und eine hohe Expression in MV4;11. Somit scheint diese miRNA eher spezifisch für AMLs zu sein als für akute Leukämien im Allgemeinen. Das Team um Marcucci *et al.* identifizierte mittels Microarrays eine Signatur von zwölf Sonden, die acht miRNAs detektieren und ebenfalls eine Prognose für AML Patienten mit normalem Karyotyp und einem hohen molekularem Risiko (das durch FLT3-ITDs und NPM1-Mutationen ermittelt wurde) erlaubt [168]. Zu dieser Signatur gehören zwei Sonden, die miR-181a spezifisch sind und drei, welche die miR-181b detektieren. Darüber hinaus zählen noch die miRs 124, 128-1, 194, 219-5p, 220a und 320 zu dieser Signatur. Weisen all diese miRNAs bei Patienten mit normalem Karyotyp und hohem molekularem Risiko eine hohe Expression auf, so ist das rückfallfreie Überleben signifikant schlechter als bei niedriger miRNA-Expression. Die miRs-124 und 128 wurden ebenfalls bei den hier vorgestellten Untersuchungen als differentiell exprimiert ermittelt und bereits in Abschnitt 4.1 detailliert diskutiert, ebenso der Einfluss einer Hypermethylierung des *miR-124* Gens. Die miR-320 zeigt eine niedrigere Expression in HSZ und B-Zellen ($\sim -0,5$), die Zelllinien zeigen eine leicht erhöhte Expression ($\sim +0,5$). Von miRs 194, 219-5p und 220 wurden nicht ausreichend Replikate detektiert, so dass keine Aussage zur ihrer Expression möglich ist. Einige Gene des angeborenen Immunsystems, die potenzielle Targets der miR-181 Familie sind, zeigen eine invers korrelierende Expression mit der miR-181-Familie, unter anderem Toll-like-Rezeptoren und Interleukin-1 β [168]. Die Autoren postulieren daher, dass eine geringe Expression dieser miRNA-Familie zu einer aggressiven Leukämie führt via Signalwege, die von den Toll-like-Rezeptoren und Interleukin-1 β kontrolliert werden. Dies erscheint jedoch unlogisch vor dem Hintergrund einer schlechten Prognose bei hoher miRNA-Expression, die von den Autoren in der gleichen Publikation präsentiert wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der beiden untersuchten miRNAs auf eine möglichen prognostische Bedeutung bei AML-Patienten hin untersucht. Aufgrund der sehr heterogenen Eigenschaften (*de novo* vs. Rezidiv, kurative vs. palliative Therapie, verschiedene zytogenetische Risikogruppen) der Patientengruppe ergaben sich nur kleine Subgruppen, die auf einen Unterschied im Überleben hin untersucht werden konnten. Die Ergebnisse sind daher als orientierend zu bewerten. Es konnten dennoch für beide miRNAs anhand der Expressionslevel Unterschiede im Gesamtüberleben in bestimmten Gruppen errechnet werden.

Die miR-181a, die ebenfalls von Marcucci *et al.* als Teil einer prognostisch relevanten miRNA-Signatur beschrieben wurde [168], zeigt in kurativ therapierten *de novo* Patienten bei sehr geringer Expression eine nicht signifikant bessere Überlebenswahrscheinlichkeit als bei hoher Expression. Allerdings zeigen nur vier von den 14 Patienten dieser Gruppe eine solch niedrige Expression, so dass hier nur eine eingeschränkte Aussagekraft besteht. Diese wird aber von den Ergebnissen von Marcucci *et al.* gestützt wird.

Der miR-142 wurde bisher noch keine prognostische Bedeutung zugeschrieben. Eine Zerteilung innerhalb der Patienten, die ein intermediäres zytogenetisches Risiko aufweisen, eine *de novo* Diagnose hatten und kurativ therapiert wurden basierend auf der miRNA-Expression, zeigt jedoch ein signifikant besseres Überleben für Patienten mit hoher miR-142 Expression. Auch hier liegt aufgrund der geringen Fallzahl von insgesamt 14 Patienten eine begrenzte Aussagekraft vor. Dennoch ist dies der erste Hinweis auf eine mögliche Bedeutung der miR-142 für die Prognose von AML-Patienten. Sie muss jedoch in einer größeren Patientengruppe bestätigt werden.

Interessanterweise zeigen die Untersuchungen der miR-181a Expression ebenso wie die bisher veröffentlichten Studien immer ein besseres Überleben in Zusammenhang mit einer geringen miRNA-Expression, so dass dieser Effekt möglicherweise weniger auf die Expression der einzelnen miRNAs zurückzuführen ist als viel mehr auf eine global verringerte miRNA Expression. Bei der miR-142 korreliert die bessere Prognose jedoch mit einer höheren miRNA-Expression.

Abschließend lässt sich festhalten, dass mit den beiden im Rahmen dieser Promotionsarbeit untersuchten miRNAs die Möglichkeit einer prognostischen Aussage gegeben ist, die jedoch an einer größeren Patientengruppe verifiziert werden muss.

4.4 Funktionelle Bedeutung der miR-181a

Im dritten Teilbereich der Dissertation wurden funktionelle Untersuchungen zur Rolle der miR-181a in akuten Leukämien durchgeführt. Es konnte sowohl eine Hemmung als auch eine Überexpression erreicht werden. Die Auswirkungen der so veränderten Expression wurden mit unterschiedlichen Methoden unter den Aspekten der Zellproliferation und -vitalität sowie potenzieller Zielgene evaluiert.

4.4.1 Methodische Aspekte

Es wurden verschiedene Ansätze zur Hemmung der miRNA-Expression in tierischen Zellen untersucht, die unterschiedliche Modifikationen des Antisenseoligonukleotides (ASO) aufweisen (zusammengefasst in [223]), um eine höhere Stabilität gegenüber zellulären RNase zu erreichen. In keiner der Publikationen wurde jedoch die Effektivität der modifizierten ASOs mit nicht-modifizierten ASOs verglichen. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Hemmung der miR-181a sowohl mit LNA-modifizierten und nicht-modifizierten ASOs. LNA-Oligonukleotide weisen eine 2'-O,4'-C-Mehtyl-Gruppe in der Ribose auf (Abb 3), welche zu einer erhöhten Stabilität gegenüber RNasen sowie einer verbesserten Spezifität bei Doppelstrang-Bindungen führt [224]. Interessanterweise konnte mit beiden ASOs eine starke Abnahme der miR-181a mittels qPCR nachgewiesen werden. Teilweise ist die Abnahme in den Zellen mit unmodifizierten ASOs zu den frühen Zeitpunkten sogar stärker als bei den LNA-modifizierten ASOs, jedoch steigt die Expression im Verlauf des Experiments auch stärker wieder an. Diese Expressionskurven entsprechen in beiden Fällen den Erwartungen, da eine geringere Spezifität bei großem Überschuss zu einer stärkeren Abnahme des Ziels führt, die geringere Stabilität gleichzeitig aber auch zu einem weniger dauerhaften Effekt. Somit scheinen kleine, einzelsträngige RNA-Moleküle wie miRNAs eine höhere Stabilität gegenüber RNasen zu besitzen als längere RNAs. Dennoch zeigen die Ergebnisse auf Proteinebene der Zielgene der miR-181a deutlich stärkere Effekte bei den LNA-ASOs. Dies wurde sowohl bei der Expression von CD4 als auch von HMGB1 beobachtet, so dass anzunehmen ist, dass dies ein vom Ziel unabhängiger Effekt ist. Der Vergleich beider Ansätze (modifiziert vs. nicht modifiziert) zeigt eine deutlich stärkere Zunahme der CD4-Expression nach 24 Stunden bei den LNA- als bei unmodifizierten ASOs bei vergleichbarer miR-181a-Expression (s. 9.14). Die höhere Spezifität der LNA-ASOs scheint somit Auswirkungen auf die Expression der Ziel-Gene zu haben, die unabhängig von der Expression der reifen miRNA ist. In der Literatur wurde ein solcher Effekt bisher nicht beschrieben, weshalb ein Vergleich mit anderen Arbeiten nicht möglich ist.

Die Überexpressions-Experimente wurden nur mit nicht-modifizierten ASOs durchgeführt. Hierin könnte die Erklärung liegen, weshalb die bei den Hemmversuchen beobachteten Effekte auf die Expression von CD4 und HMGB1 nicht bestätigt werden konnten.

Ein weiterer Aspekt beim Vergleich der LNA- mit den unmodifizierten ASOs ist die deutlich geringere Proliferation der Zellen, die mit den LNA-ASOs transfiziert wurden. Dies ist auf die Verwendung von H₂O als Lösungsmittel im Vergleich zu dem Suspensionspuffer mit physiologischen Salzkonzentrationen bei den unmodifizierten ASOs zurückzuführen. Wasser löst bei der Elektroporation größere osmotische Effekte aus, so dass die Zellen sich schwerer von der Transfektion erholen. Die LNA-ASOs waren jedoch nur bereits in Wasser gelöst erhältlich.

4.4.2 Bedeutung der miR-181a für die Proliferation und Zellfunktionen

Die Bestimmung der Zellproliferation sowie der metabolischen Aktivität liefert eine aussagekräftige Angabe über den vitalen Zustand der Zellen. Eine Unterscheidung der toten Zellen in apoptotische und nekrotische Zellen ermöglicht darüber hinaus eine Information über die zugrunde liegenden Mechanismen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen der miR-181a auf jeden dieser vier Prozesse untersucht.

Eine Hemmung der miR-181a in Zellen, die endogen eine hohe miR-181a Expression aufweisen, zeigt keine Auswirkungen auf die Zellproliferation, metabolische Aktivität oder den Zelltod. Der leichte Anstieg in der Apoptose- und Nekroserate im Anschluss an die Elektroporation ist in allen Proben, einschließlich der Kontrollen, zu beobachten und dürfte eine Folge dieser Prozedur sein. Die Zelllinie Jurkat zeigt nach 24 Stunden zwar eine signifikant höhere Apoptoserate als die mit Wasser transfizierte Kontrolle, gegenüber der unspezifischen ASO war dieser Wert jedoch nicht signifikant. Da auch im weiteren Verlauf keine gegenüber den Kontrollen höheren Werte gemessen wurden, ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um einen unspezifischen Effekt handelt.

Die Überexpression der miR-181a in einer Zelllinie mit einer endogen geringen miR-181a Expression führt zu einer signifikant geringeren Zellproliferation und metabolischen Aktivität sowie einer verstärkten Nekroserate nach 72 Stunden. In Zellen mit einer hohen miR-181a Expression ist dieser Effekt nicht zu beobachten. Dies könnte mehrere Gründe haben. Zum einen handelt sich bei der Zelllinie mit geringer miR-181a Expression um die einzige AML-Zelllinie (HL60), die anderen untersuchten Zellen stammen von ALL-Zelllinien. Somit könnte dies ein Effekt sein, der in myeloiden Zellen auftritt, nicht jedoch in lymphoiden. Des Weiteren könnte eine endogen hohe miR-181a Expression auf die Zellen desensibilisierend wirken, so dass sie auf eine weitere Steigerung der Expression weniger empfindlich reagieren als Zellen mit geringer Expression. Jedoch wurde eine solch hohe Überexpression erzielt, dass dieser Effekt vernachlässigt werden kann.

Mögliche, an diesem Effekt der verminderten Zellproliferation und metabolischen Aktivität beteiligt Zielgene der miR-181a sind das zelluläre Onkogen FOS, das eine Rolle in der Regulation der Zellproliferation spielt und durch die Signalkaskade MOS/MEK/ERK aktiviert wird [225]. Die MAP3K10, die verschiedene Janus-Kinasen aktiviert, verfügt ebenfalls über eine miR-181a Bindestelle. Besonders interessant ist eine mögliche Regulation des Hitzshockproteins 90B (HSP90B) durch die miR-181a. Dies Protein übt einen positiven Effekt auf die Zellproliferation aus. Es wird jedoch durch die in die Nekrose involvierte Familie der Calpaine gespalten [226]. Führt nun eine Überexpression der miR-181a zu einer Abnahme von HSP90B, so könnte das physiologische Erscheinungsbild dem der durch die Spaltung von HSP90B durch Calpaine hervorgerufenem ähneln und somit die erhöhte Nekroserate erklären. Darüber hinaus besitzen die beiden Proteine DDIT4 (DNA-damaged-induced-transcript 4) sowie DEPDC6 (DEP domain-containing mTOR-interacting protein 6) mögliche miR-181a Bindestellen. Beide Proteine greifen in den mTOR-Signalweg ein und inhibieren so dessen proliferationsfördernde Eigenschaften [227-228]. In diesen Fällen müsste allerdings eine positive Regulation der Translation durch die miR-181a vorliegen.

4.4.3 Bedeutung der Regulation von CD4 durch die miR-181a

Das Glykoprotein CD4 gehört zur Ig-Großfamilie und wird von T-Helferzellen exprimiert. Es handelt sich um einen Korezeptor, der gemeinsam mit dem T-Zell-Rezeptor MHC Klasse II Moleküle erkennt und somit wesentlich zur Aktivierung von T-Zellen beiträgt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von CD4 im Verlauf von Hemmung und Überexpression der miR-181a untersucht.

Es konnte ein geringer, aber signifikanter Anstieg der CD4 Expression in der Zelllinie MOLT-4 bei einer Hemmung der miR-181a beobachtet werden, der sich nur sehr gering auf die Anzahl der CD4-positiven Zellen auswirkt. Dies erscheint vor dem Hintergrund der miRNA-Wirkungsmechanismen logisch: Da miRNAs mRNAs beeinflussen, kann sich der Effekt einer Hemmung nur in solchen Zellen zeigen, die die entsprechende mRNA überhaupt transkribieren. Ist keine mRNA vorhanden, kann es keine Auswirkungen der Manipulation der miRNA-Expression geben. Dies erklärt auch, weshalb in der nur schwach CD4 positiven Zelllinie Jurkat kein Effekt zu beobachten war. Dennoch war der Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität schwächer als erwartet, was die Regulation der CD4 mRNA durch weitere Faktoren nahe legt, die die Funktion der miR-181a übernehmen könnten. Hierzu zählen die weiteren Mitglieder der miR-181 Familie, die an die gleiche Stelle der 3'UTR der CD4 mRNA binden können, sowie die beiden miRNAs 221 und 222 [229]. Beide liegen in einem Cluster auf dem X-Chromosom und können die CD4 mRNA an den Nukleotiden 77-83 binden. Sie spielen eine wichtige Rolle in der

Erythrozyten-Differenzierung. Interessanterweise wurden von der Datenbank miRCOSM neben den miRs 181cd nur miRNAs identifiziert, denen bisher keine Rolle in der Hämatopoese zugeschrieben wurde [230]. Ein weiterer Grund für den geringen Anstieg von CD4 könnte in der Halbwertszeit des Proteins CD4 liegen. MiRNAs beeinflussen die Neubildung von Proteinen, nicht jedoch einen Abbau bereits vorhandenen Proteins, so dass bei einer langen Lebensdauer der Einfluss der miRNA Hemmung bei steigender Inkubationszeit größer sein dürfte. Zu den späteren Zeitpunkten zeigt sich ein weiterer Anstieg der rMFI. Allerdings sind die Schwankungen innerhalb der drei Messungen größer als zu den früheren Zeitpunkten, so dass hier keine Signifikanz vorliegt. In den Überexpressionsversuchen konnte kein Einfluss auf die Expression von CD4 beobachtet werden. Es liegt zwar eine leicht niedrigere rMFI nach 72 Stunden vor, die allerdings nicht signifikant ist. Dies könnte, wie oben erwähnt, an der Tatsache liegen, dass diese Experimente mit nicht-modifizierten ASOs durchgeführt wurden.

Der Einfluss der miR-181a auf die Expression von CD4 und somit auf die Aktivierungsfähigkeiten der T-Zelle liegen in einer Reihe mit den bisherigen Publikationen zur Rolle der miR-181a [40]. Es bleibt jedoch offen, ob dies sowie eine mögliche Dysregulierung der miR-181a Expression eine Rolle in der Leukämiegenese spielt.

4.4.4 Regulation des HMGB1 durch die miR-181a

Das Protein HMGB1 gehört zur Familie der *high-mobility group box* DNA-bindender Proteine. Es wird im humanem Genom auf Chromosom 13q12 codiert und besitzt eine Länge von 215 Aminosäuren. Strukturell kennzeichnend sind seine zwei DNA-Bindedomänen (A- und B-Box), die unspezifisch an die kleine Furche der DNA binden, diese biegen und so die Bindung weiterer Faktoren ermöglichen. Innerhalb der B-Box befindet sich darüber hinaus eine proinflammatorische Zytokin-Domäne, die nach der Freisetzung von HMGB1 durch Makrophagen zur Aktivierung von Monozyten und Bildung von TNF α und IL-1 führt. Hierbei erfolgt die Bindung über den RAGE-Rezeptor, aber auch über TLR2 und TLR4. HMGB1 wird auch von nekrotischen Zellen freigesetzt und führt so zu einer Entzündung des umliegenden Gewebes. Aufgrund dieser zwei sehr unterschiedlichen Fähigkeiten (Transkriptionsaktivator und Zytokin) ist HMGB1 von besonderem Interesse in der medizinischen Forschung.

Aufgrund der von Debernardi *et al.* beschriebenen korrelierenden Expression von HMGB1 und der miR-181a [41] sowie der potenziellen Bindestelle der miR-181a innerhalb der HMGB1-mRNA wurde die HMGB1-Expression in Zusammenhang mit der miRNA Hemmung bzw. Überexpression untersucht. In allen drei untersuchten Zelllinien konnte bei einer Hemmung der miRNA auch eine Hemmung des HMGB1 beobachtet werden. Wie schon bei der möglichen Regulation der Proteine DDIT4 und DEPCD6 durch die miR-181a muss daher auch hier eine

Aktivierung der Transkription des HMGB1 durch die miR-181a vorliegen, die bei einer miR-181a Hemmung weg fällt. Allerdings zeigte sich bei der Überexpression der miRNA keine veränderte HMGB1-Expression. Demzufolge müssen noch weitere Faktoren eine Rolle spielen, welche in die Regulation der HMGB1-Expression eingreifen. Auch könnte es sein, dass die positive Korrelation zwischen miRNA und HMGB1 durch eine indirekte Beeinflussung der miRNA zurückzuführen ist, auch wenn HMGB1 eine direkte miRNA-Bindestelle besitzt. Interessanterweise befindet sich innerhalb der 3'UTR des HMGB1 ebenfalls eine Bindestelle für die miR-142. Somit scheint eine Regulation des HMGB1 durch zumindest zwei hämatopoetische miRNAs möglich zu sein. Welche Rolle eine Dysregulation des HMGB1, eventuell ausgelöst durch eine miRNA-Dysregulation, bei der Entstehung von akuten Leukämien spielt, konnte noch nicht geklärt werden.

4.4.5 Regulation des PI3K/Akt-Signalweges durch miRNAs

Der PI3K/Akt Signalweg nimmt eine entscheidende Rolle in der Homöostase der Zellen mit weitreichenden physiologischen Effekten ein. Hierzu zählen Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose-Hemmung. Verschiedene Tumore zeigen in bis zu 30% eine aktivierenden Mutation in der katalytischen Untereinheit der PI3K, in hämatologischen Erkrankungen treten sie jedoch mit nur 3% auf [231]. Mutationen im Akt1-Gen sind noch seltener beobachtet worden [232]. Dennoch liegt in 50% der AML-Fälle eine konstitutive Aktivierung des Signalweges vor [233]. Dies deutet daraufhin, dass weniger die Schlüsselmoleküle PI3K und Akt, sondern vielmehr die Regulatoren (wie z.B. PTEN, TCL1 oder SHIP1) eine Dysregulation aufweisen und somit zur Aktivierung des Signalweges führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der miR-181a auf diesen Signalweg unter zwei Aspekten untersucht. Zum einen wurde eine Regulation des Akt-Coaktivators TCL1 in CLL-Zellen durch die miR-181b beschrieben, zum anderen weist die 3'UTR des Moleküls PTEN eine potenzielle Bindestelle der miR-181a auf.

Der Akt-Coaktivator TCL1 ist ein 114 Aminosäuren langes Peptid, das von unreifen B-Zellen, einigen Dendritischen Zellen und CD3⁺CD4⁺CD8⁻ T-Zell-Vorläufern gebildet wird. Es interagiert mit der Pleckstrin-Homologie-Domäne von Akt und verstärkt so dessen Kinaseaktivität [43]. Pekarsky *et al.* konnten zeigen, dass in vielen CLL-Zellen die Expression von TCL1 invers mit der Expression der miR-29b und miR-181b korreliert. Eine Überexpression der einzelnen miRNAs führt zu einer Abnahme der Proteinmenge von TCL1 [42]. Es wurden keine Untersuchungen zur Auswirkung dieser miRNAs auf den PI3K-Akt-Signalweg durchgeführt. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen keine Veränderung durch eine Modulation der miR-181a Expression im Phosphorylierungsstatus von Akt, der als Grad der Aktivität gilt. Dies könnte an den 13 % Unterschied in der Sequenz der miRs 181a und b liegen, da bereits die Abweichung eines

Nukleotides den Effekt der miRNA unterbinden kann [27]. Darüber hinaus wurde die Expression von TCL1 selbst nicht untersucht, so dass keine gleichzeitigen Daten über die Expression des Coaktivators und der Aktivität von Akt vorliegen. Zum dritten könnte der Effekt der Aktivierung durch TCL1 nicht direkt an der Phosphorylierung von Akt messbar sein, sondern sich weiter unten in der Signalkaskade zeigen. Dennoch müssten in diesem Fall die Auswirkungen einer stärkeren Akt-Aktivität sichtbar sein, wie z.B. eine verstärkte Zellproliferation und eine geringere Apoptoserate. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden, so dass davon auszugehen ist, dass TCL1 zwar durch die miR-181b, nicht jedoch durch die miR-181a reguliert wird.

Das Protein PTEN stellt einen negativen Regulator des PI3K/Akt-Signalweges dar, in dem es die Dephosphorylierung des *second messenger* PIP3 zu PIP2 katalysiert und so eine Aktivierung von Akt unterbindet. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen der miR-181a auf die Expression von PTEN untersucht. Es konnten jedoch keine Effekte einer Modulation der miRNA-Expression auf PTEN beobachtet werden. Somit ist eine Regulation dieses Proteins durch die miR-181a ausgeschlossen. Dennoch konnten Yang *et al.* 2008 eine Regulation des PTENs durch die miR-214 zeigen [183], die mit einer verstärkten Aktivität von Akt einher geht.

Der PI3K/Akt-Signalweg scheint somit auf unterschiedlichem Weg durch miRNAs beeinflusst zu werden, jedoch nicht durch die miR-181a.

4.4.6 Möglicher Einfluss der miR-181a auf die Hämatopoese

Die bisherigen Daten beschreiben für die miR-181a eine Rolle in der Hämatopoese und in der Regulation der Immunantwort [39-40]. Im Folgenden werden weitere, potenzielle Ziele der miR-181a und ihre mögliche Rolle innerhalb dieser Prozesse diskutiert, die von den Datenbanken targetscan und miRCOSM gemeinsam als mögliche Zielgene angegeben werden.

Zu den Zielgenen mit einem möglichen Einfluss in der Hämatopoese zählen das Polycomb Protein EED, das an der Histonmethylierung beteiligt ist und die Expression verschiedener Hox-Gene, darunter HOXA9, unterdrückt [234]. Ein weiteres Mitglied der Polycomb Familie, PCGF2, reguliert die Expression der Chemokin-Rezeptoren CXCR4 und CXCR7, welche sowohl von unreifen als auch reifen hämatopoetischen Zellen exprimiert werden [235]. Der Transkriptionsfaktor LMO1 führt bei einer gemeinsamen Überexpression mit OLIG2 in Mäusen zur Entstehung von T-ALLs bei gleichzeitiger Hochregulierung von NOTCH-1 [236]. Der Transkriptionsaktivator MybA ist möglicherweise in die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen involviert. Darüber hinaus zeigt auch das DNA-Bindeprotein CHD7 eine miR-181a Bindestelle. Eine Mutation innerhalb des Gens korreliert stark mit einer T-Zell-Dysfunktion [237]. All diese möglichen Zielgene unterstützen das Potenzial der miR-181a, bei einer Dysregulation zur Leukämiegenese beizutragen.

Zusammenfassung und Ausblick

Das Verständnis über Entstehung und Verlauf akuter Leukämien ist trotz intensiver Forschungen noch immer unzureichend und die Prognose ist nach wie vor unbefriedigend. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Regulation und Rolle von miRNAs sowohl auf Expressions- als auch auf funktioneller Ebene in leukämischen Zellen.

Genexpressionsprofile mittels Microarrays bieten die Möglichkeit, zeitgleich eine Vielzahl möglicherweise differentiell exprimierter Gene zu untersuchen und eventuelle Kandidatengene zu identifizieren, die in der Pathogenese der zugrunde liegender Erkrankung involviert sind. In der vorliegenden Arbeit wurden miRNA Expressionsprofile von zwei gesunden hämatologischen Zellpopulationen (HSZ und B-Zellen) sowie drei Zelllinien, die eine gleiche Translokation hatten, durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Dabei wurden 53 miRNAs als unterschiedlich exprimiert ermittelt. Diese können in weiteren Versuchen detailliert untersucht werden. Es konnte keine für die Translokation t(4;11) spezifische miRNA identifiziert werden. Allerdings zeigten sich andere, differenziell exprimierte miRNAs, wie z.B. die miRs 126 und 130a, die für die Aufrechterhaltung des Stammzellstatus wichtig sind. Viele der in den Zelllinien stark exprimierten miRNAs wurden schon im Zusammenhang mit akuten Leukämien beschrieben. Einige dieser miRNAs bieten vielversprechende funktionelle und therapeutische Ansätze, wie z.B. die miRs 34 und 128. Insgesamt bietet das hier vorgestellte miRNA Expressionsprofil der Leukämiezelllinien einen Einblick in mögliche Prozesse bei denen dysregulierte miRNAs eine Rolle spielen. Zukünftige Untersuchungen können auf die hier als differenzielle exprimierten miRNAs zurück greifen und deren genaue Bedeutung in der Pathogenese der akuten Leukämie identifizieren.

Die Untersuchungen der miRNAs 142 und 181a in Leukämie-Zelllinien sowie *de novo* Material von Patienten mit akuter Leukämie ergaben ein komplexes Expressionsmuster. Es bestätigt die bisher zur miRNA Expression in hämatopoetischen Zellen publizierten Daten. So gab es Patienten, bei denen die miR-142 bzw. miR-181a stark exprimiert wurden im Vergleich zu gesunden HSZ, einige wenige Patienten zeigten eine niedrigere Expression. Untersucht man den klinischen Verlauf dieser Patienten, so scheint es als könnte sowohl die Expression der miR-142 als auch der miR-181a eine mögliche prognostische Bedeutung haben. Diese Ergebnisse sind interessant und erstmalig beschrieben. Sie sollten daher unbedingt in einer größeren Patientengruppe validiert werden.

Die funktionellen Analysen zur Bedeutung der miR-181a in hämatopoetischen Zellen ergab verschiedene Prozesse und Zielgene, die durch die miR-181a beeinflusst werden. So führt eine Überexpression in AML-Zellen zu einer verminderten Zellproliferation und -vitalität. Dies kann durch unterschiedliche, potenzielle Zielgene der miR-181a wie das HSP90B oder DDIT4

und DEPDC6 vermittelt werden. Darüber hinaus konnten mit dem Oberflächenmolekül CD4 sowie dem Zytokin HMGB1 zwei durch die miR-181a regulierte Proteine identifiziert werden. CD4 übernimmt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen. Eine Regulation durch die miR-181a bestätigt die bisher beschriebenen Effekte der miRNA auf die Funktion der T-Zelle. HMGB1 stellt aufgrund seiner vielseitigen Funktionen als Transkriptionsaktivator und Zytokin einen interessanten Forschungsansatz verschiedener Erkrankungen dar. Die Regulation der durch die miR-181a bietet hier einen neuen Ansatzpunkt zur Modulation der HMGB1-Expression.

Zusammenfassend bietet die vorliegende Arbeit neue Einblicke in die Expression von miRNAs in hämatopoetischen Zellen und liefert neue interessante Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen.

5. Literatur

- [1] ALTUVIA, Y., LANDGRAF, P., LITHWICK, G., ELEFANT, N., PFEFFER, S., ARAVIN, A., BROWNSTEIN, M.J., TUSCHL, T. and MARGALIT, H. (2005) Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res*, **33**, 2697-706.
- [2] LEE, Y., KIM, M., HAN, J., YEOM, K., LEE, S., BAEK, S.H. and KIM, V.N. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, **23**, 4051-60.
- [3] BORCHERT, G.M., LANIER, W. and DAVIDSON, B.L. (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 1097-101.
- [4] SAITO, Y., LIANG, G., EGGER, G., FRIEDMAN, J.M., CHUANG, J.C., COETZEE, G.A. and JONES, P.A. (2006) Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*, **9**, 435-43.
- [5] LUJAMBIO, A., CALIN, G.A., VILLANUEVA, A., ROPERO, S., SANCHEZ-CESPEDES, M., BLANCO, D., MONTUENGA, L.M., ROSSI, S., NICOLOSO, M.S., FALLER, W.J., GALLAGHER, W.M., ECCLES, S.A., CROCE, C.M. (2008) A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 13556-61.
- [6] KIM, Y. and KIM, V.N. (2007) Processing of intronic microRNAs. *EMBO J*, **26**, 775-83.
- [7] MORLANDO, M., BALLARINO, M., GROMAK, N., PAGANO, F., BOZZONI, I. and PROUDFOOT, N.J. (2008) Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 902-9.
- [8] GUIL, S. and CACERES, J.F. (2007) The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 591-6.
- [9] YANG, W., CHENDRIMADA, T.P., WANG, Q., HIGUCHI, M., SEEBURG, P.H., SHIEKHATTAR, R. and NISHIKURA, K. (2006) Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 13-21.
- [10] SCADDEN, A.D.J. (2005) The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 489-96.
- [11] KAWAHARA, Y., MEGRAW, M., KREIDER, E., IIZASA, H., VALENTE, L., HATZIGEORGIU, A.G. and NISHIKURA, K. (2008) Frequency and fate of microRNA editing in human brain. *Nucleic Acids Res*, **36**, 5270-80.
- [12] LUND, E., GUTTINGER, S., CALADO, A., DAHLBERG, J.E. and KUTAY, U. (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, **303**, 95-8.
- [13] KHVOROVA, A., REYNOLDS, A. and JAYASENA, S.D. (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, **115**, 209-16.
- [14] DIEDERICH, S. and HABER, D.A. (2007) Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*, **131**, 1097-108.
- [15] FU, H., TIE, Y., XU, C., ZHANG, Z., ZHU, J., SHI, Y., JIANG, H., SUN, Z. and ZHENG, X. (2005) Identification of human fetal liver miRNAs by a novel method. *FEBS Lett*, **579**, 3849-54.
- [16] KUCHENBAUER, F., MORIN, R.D., ARGIROPOULOS, B., PETRIV, O.I., GRIFFITH, M., HEUSER, M., YUNG, E., PIPER, J., DELANEY, A., PRABHU, A., ZHAO, Y., McDONALD, H., ZENG, T., HIRST, M., HANSEN, C.L. and MA, (2008) In-depth characterization of the microRNA transcriptome in a leukemia progression model. *Genome Res*, **18**, 1787-97.
- [17] YEKTA, S., SHIH, I.H. and BARTEL, D.P. (2004) MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*, **304**, 594-6.
- [18] MEISTER, G., LANDTHALER, M., PATKANIOWSKA, A., DORSETT, Y., TENG, G. and TUSCHL, T. (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, **15**, 185-97.
- [19] WU, L., FAN, J. and BELASCO, J.G. (2006) MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 4034-9.
- [20] CHEKULAEVA, M. and FILIPOWICZ, W. (2009) Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr Opin Cell Biol*, **21**, 452-60.

- [21] HUMPHREYS, D.T., WESTMAN, B.J., MARTIN, D.I.K. and PREISS, T. (2005) MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 16961-6.
- [22] PETERSEN, C.P., BORDELEAU, M., PELLETIER, J. and SHARP, P.A. (2006) Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell*, **21**, 533-42.
- [23] NOTTROTT, S., SIMARD, M.J. and RICHTER, J.D. (2006) Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 1108-14.
- [24] VASUDEVAN, S., TONG, Y. and STEITZ, J.A. (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, **318**, 1931-4.
- [25] HENKE, J.I., GOERGEN, D., ZHENG, J., SONG, Y., SCHUTTLER, C.G., FEHR, C., JUNEMANN, C. and NIEPMANN, M. (2008) microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J*, **27**, 3300-10.
- [26] JOPLING, C.L., SCHUTZ, S. and SARNOW, P. (2008) Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe*, **4**, 77-85.
- [27] LIU, G., MIN, H., YUE, S. and CHEN, C. (2008) Pre-miRNA loop nucleotides control the distinct activities of mir-181a-1 and mir-181c in early T cell development. *PLoS ONE*, **3**, e3592.
- [28] SHEN, W., HU, Y., UTTARWAR, L., PASSEGUE, E. and LARGMAN, C. (2008) MicroRNA-126 regulates HOXA9 by binding to the homeobox. *Mol Cell Biol*, **28**, 4609-19.
- [29] LAGOS-QUINTANA, M., RAUHUT, R., YALCIN, A., MEYER, J., LENDECKEL, W. and TUSCHL, T. (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*, **12**, 735-9.
- [30] CALIN, G.A., SEVIGNANI, C., DUMITRU, C.D., HYSLOP, T., NOCH, E., YENDAMURI, S., SHIMIZU, M., RATTAN, S., BULLRICH, F., NEGRINI, M. and CROCE, C.M. (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 2999-3004.
- [31] GAUWERKY, C.E., HUEBNER, K., ISOBE, M., NOWELL, P.C. and CROCE, C.M. (1989) Activation of MYC in a masked t(8;17) translocation results in an aggressive B-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 8867-71.
- [32] GUENTHER, M.G., JENNER, R.G., CHEVALIER, B., NAKAMURA, T., CROCE, C.M., CANAANI, E. and YOUNG, R.A. (2005) Global and Hox-specific roles for the MLL1 methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 8603-8.
- [33] CHEN, C., LI, L., LODISH, H.F. and BARTEL, D.P. (2004) MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, **303**, 83-6.
- [34] LANDGRAF, P., RUSU, M., SHERIDAN, R., SEWER, A., IOVINO, N., ARAVIN, A., PFEFFER, S., RICE, A., KAMPHORST, A.O., LANDTHALER, M., LIN, C., SOCCI, N.D., HERMIDA, L., FULCI, V. and CHIARETTI, S. (2007) A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, **129**, 1401-14.
- [35] DOSTIE, J., MOURELATOS, Z., YANG, M., SHARMA, A. and DREYFUSS, G. (2003) Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA*, **9**, 180-6.
- [36] miRBase: *hsa-miR-181a-1*. URL http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000289. - 12.01.2010.
- [37] miRBase: *hsa-miR-181a-2*. URL http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000269. - 12.01.2010.
- [38] CHEN, C. and LODISH, H.F. (2005) MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. *Semin Immunol*, **17**, 155-65.
- [39] NEILSON, J.R., ZHENG, G.X.Y., BURGE, C.B. and SHARP, P.A. (2007) Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Genes Dev*, **21**, 578-89.
- [40] LI, Q., CHAU, J., EBERT, P.J.R., SYLVESTER, G., MIN, H., LIU, G., BRAICH, R., MANOHARAN, M., SOUTSCHEK, J., SKARE, P., KLEIN, L.O., DAVIS, M.M. and CHEN, C. (2007) miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell*, **129**, 147-61.

- [41] DEBERNARDI, S., SKOULAKIS, S., MOLLOY, G., CHAPLIN, T., DIXON-MCIVER, A. and YOUNG, B.D. (2007) MicroRNA miR-181a correlates with morphological sub-class of acute myeloid leukaemia and the expression of its target genes in global genome-wide analysis. *Leukemia*, **21**, 912-6.
- [42] NOGUCHI, M., ROPARS, V., ROUMESTAND, C. and SUIZU, F. (2007) Proto-oncogene TCL1: more than just a coactivator for Akt. *FASEB J*, **21**, 2273-84.
- [43] PEKARSKY, Y., SANTANAM, U., CIMMINO, A., PALAMARCHUK, A., EFANOV, A., MAXIMOV, V., VOLINIA, S., ALDER, H., LIU, C., RASSENTI, L., CALIN, G.A., HAGAN, J.P., KIPPS, T. and CROCE, C.M. (2006) Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res*, **66**, 11590-3.
- [44] GRIMWADE, D., WALKER, H., OLIVER, F., WHEATLEY, K., HARRISON, C., HARRISON, G., REES, J., HANN, I., STEVENS, R., BURNETT, A. and GOLDSTONE, A. (1998) The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*, **92**, 2322-33.
- [45] MROZEK, K. and BLOOMFIELD, C.D. (2006) Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 169-77.
- [46] HOELZER, D., ARNOLD, R., BARTRAM, C.R., BOHME, A., FREUND, M., GANSER, A., KNEBA, M., LIPP, T., LUDWIG, W.D., MASCHMEYER, G., RIEDER, H., THIEL, E., MESSERER, D., WEISS, A. and GOKBUGET, N. (2002) Akute lymphatische Leukämie des Erwachsenen. Diagnostik, Risikogruppen und Therapie. *Internist (Berl)*, **43**, 1212-6, 1219-22, 1224-7.
- [47] OTTMANN, O.G. and WASSMANN, B. (2005) Treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 118-22.
- [48] SATTLER, M. and GRIFFIN, J.D. (2003) Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene. *Semin Hematol*, **40**, 4-10.
- [49] CAYO, M., GREENBLATT, D.Y., KUNNIMALAIYAAN, M. and CHEN, H.: *NOTCH1 (Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila))*. URL <http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/NOTCH1ID30ch9q34.html>. - 23.11.09.
- [50] SHARMA, V.M., DRAHEIM, K.M. and KELLIHER, M.A. (2007) The Notch1/c-Myc pathway in T cell leukemia. *Cell Cycle*, **6**, 927-30.
- [51] XU, F., TAKI, T., YANG, H.W., HANADA, R., HONGO, T., OHNISHI, H., KOBAYASHI, M., BESSHO, F., YANAGISAWA, M. and HAYASHI, Y. (1999) Tandem duplication of the FLT3 gene is found in acute lymphoblastic leukaemia as well as acute myeloid leukaemia but not in myelodysplastic syndrome or juvenile chronic myelogenous leukaemia in children. *Br J Haematol*, **105**, 155-62.
- [52] TAKETANI, T., TAKI, T., SUGITA, K., FURUICHI, Y., ISHII, E., HANADA, R., TSUCHIDA, M., SUGITA, K., IDA, K. and HAYASHI, Y. (2004) FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperdiploidy. *Blood*, **103**, 1085-8.
- [53] ROWE, J.M. (2009) Optimal management of adults with ALL. *Br J Haematol*, **144**, 468-83.
- [54] STRAHL, B.D., OHBA, R., COOK, R.G. and ALLIS, C.D. (1999) Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14967-72.
- [55] ERNST, P., MABON, M., DAVIDSON, A.J., ZON, L.I. and KORSMEYER, S.J. (2004) An Mll-dependent Hox program drives hematopoietic progenitor expansion. *Curr Biol*, **14**, 2063-9.
- [56] MEYER, C., KOWARZ, E., HOFMANN, J., RENNEVILLE, A., ZUNA, J., TRKA, J., BEN ABDELALI, R., MACINTYRE, E., DE BRAEKELEER, E., DE BRAEKELEER, M., DELABESSE, E., DE OLIVEIRA, M.P., CAVE, H., CLAPPIER, E., VAN DONGEN, J.J.M., BALGOBIND, B.V. and VAN DEN HEUV, (2009) New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia*, **23**, 1490-9.

- [57] PUI, C.H., FRANKEL, L.S., CARROLL, A.J., RAIMONDI, S.C., SHUSTER, J.J., HEAD, D.R., CRIST, W.M., LAND, V.J., PULLEN, D.J. and STEUBER, C.P. (1991) Clinical characteristics and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(4;11)(q21;q23): a collaborative study of 40 cases. *Blood*, **77**, 440-7.
- [58] BEHM, F.G., SMITH, F.O., RAIMONDI, S.C., PUI, C.H. and BERNSTEIN, I.D. (1996). Human homologue of the rat chondroitin sulfate proteoglycan, NG2, detected by monoclonal antibody 7.1, identifies childhood acute lymphoblastic leukemias with t(4;11)(q21;q23) or t(11;19)(q23;p13) and MLL gene rearrangements. *Blood*, **87**, 1134-9.
- [59] ARMSTRONG, S.A., STAUNTON, J.E., SILVERMAN, L.B., PIETERS, R., DEN BOER, M.L., MINDEN, M.D., SALLAN, S.E., LANDER, E.S., GOLUB, T.R. and KORSMEYER, S.J. (2002) MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet*, **30**, 41-7.
- [60] CHEN, C., RIDZON, D.A., BROOMER, A.J., ZHOU, Z., LEE, D.H., NGUYEN, J.T., BARBISIN, M., XU, N.L., MAHUVAKAR, V.R., ANDERSEN, M.R., LAO, K.Q., LIVAK, K.J. and GUEGLER, K.J. (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **33**, e179.
- [61] PFAFFL, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **29**, e45.
- [62] PFAFFL, M.W., HORGAN, G.W. and DEMPFFLE, L. (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, **30**, e36.
- [63] HEIDENREICH, O., KRAUTER, J., RIEHLE, H., HADWIGER, P., JOHN, M., HEIL, G., VORNLOCHER, H. and NORDHEIM, A. (2003) AML1/MTG8 oncogene suppression by small interfering RNAs supports myeloid differentiation of t(8;21)-positive leukemic cells. *Blood*, **101**, 3157-63.
- [64] VAN ENGELAND, M., NIELAND, L.J., RAMAEKERS, F.C., SCHUTTE, B. and REUTELINGSPERGER, C.P. (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, **31**, 1-9.
- [65] BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54.
- [66] GRIMSON, A., FARH, K.K., JOHNSTON, W.K., GARRETT-ENGELE, P., LIM, L.P. and BARTEL, D.P. (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*, **27**, 91-105.
- [67] LEWIS, B.P., BURGE, C.B. and BARTEL, D.P. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, **120**, 15-20.
- [68] ENRIGHT, A.J., JOHN, B., GAUL, U., TUSCHL, T., SANDER, C. and MARKS, D.S. (2003) MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol*, **5**, R1.
- [69] GRIFFITHS-JONES, S., GROCOCK, R.J., VAN DONGEN, S., BATEMAN, A. and ENRIGHT, A.J. (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*, **34**, D140-4.
- [70] GRIFFITHS-JONES, S., SAINI, H.K., VAN DONGEN, S. and ENRIGHT, A.J. (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*, **36**, D154-8.
- [71] PONS, A., NOMDEDEU, B., NAVARRO, A., GAYA, A., GEL, B., DIAZ, T., VALERA, S., ROZMAN, M., BELKAID, M., MONTSERRAT, E. and MONZO, M. (2009) Hematopoiesis-related microRNA expression in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*, 1-6.
- [72] GRISENDI, S., MECUCCI, C., FALINI, B. and PANDOLFI, P.P. (2006) Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer*, **6**, 493-505.
- [73] GARZON, R., VOLINIA, S., LIU, C.G., FERNANDEZ-CYMERING, C., PALUMBO, T., PICHIORRI, F., FABBRI, M., COOMBES, K., ALDER, H., NAKAMURA, T., FLOMENBERG, N., MARCUCCI, G., CALIN, G.A., KORNBLAU, S.M., KANTARJIAN, H., BLOOMFIELD, C.D., ANDREEFF, M. and CROCE, (2008) MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*, **111**, 3183-9.
- [74] GANGARAJU, V.K. and LIN, H. (2009) MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nat Rev*

Mol Cell Biol, **10**, 116-25.

- [75] SAITO, Y., FRIEDMAN, J.M., CHIHARA, Y., EGGER, G., CHUANG, J.C. and LIANG, G. (2009) Epigenetic therapy upregulates the tumor suppressor microRNA-126 and its host gene EGFL7 in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **379**, 726-31.
- [76] LI, Z., LU, J., SUN, M., MI, S., ZHANG, H., LUO, R.T., CHEN, P., WANG, Y., YAN, M., QIAN, Z., NEILLY, M.B., JIN, J., ZHANG, Y., BOHLANDER, S.K., ZHANG, D., LARSON, R.A., LE BEAU, M.M. and THIR, (2008) Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 15535-40.
- [77] NAKAMURA, T., CANAANI, E. and CROCE, C.M. (2007) Oncogenic All1 fusion proteins target Drosha-mediated microRNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 10980-5.
- [78] GARZON, R., PICHIORRI, F., PALUMBO, T., IULIANO, R., CIMMINO, A., AQEILAN, R., VOLINIA, S., BHATT, D., ALDER, H., MARCUCCI, G., CALIN, G.A., LIU, C., BLOOMFIELD, C.D., ANDREEFF, M. and CROCE, (2006) MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 5078-83.
- [79] YANG, G., WANG, F., YU, J., WANG, X., YUAN, J. and ZHANG, J. (2009) MicroRNAs are involved in erythroid differentiation control. *J Cell Biochem*, **107**, 548-56.
- [80] WANG, S., AURORA, A.B., JOHNSON, B.A., QI, X., MCANALLY, J., HILL, J.A., RICHARDSON, J.A., BASSEL-DUBY, R. and OLSON, E.N. (2008) The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell*, **15**, 261-71.
- [81] HARRIS, T.A., YAMAKUCHI, M., FERLITO, M., MENDELL, J.T. and LOWENSTEIN, C.J. (2008) MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 1516-21.
- [82] HU, Z., LI, X., JORGENSEN, M.L. and SLAYTON, W.B. (2009) MLL/AF-4 leukemic cells recruit new blood vessels but do not incorporate into capillaries in culture or in a NOD/SCID xenograft model. *Leukemia*, **23**, 990-3.
- [83] GUO, C., SAH, J.F., BEARD, L., WILLSON, J.K.V., MARKOWITZ, S.D. and GUDA, K. (2008) The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling and is frequently lost in colon cancers. *Genes Chromosomes Cancer*, **47**, 939-46.
- [84] LAWRENCE, H.J., ROZENFELD, S., CRUZ, C., MATSUKUMA, K., KWONG, A., KOMUVES, L., BUCHBERG, A.M. and LARGMAN, C. (1999) Frequent co-expression of the HOXA9 and MEIS1 homeobox genes in human myeloid leukemias. *Leukemia*, **13**, 1993-9.
- [85] SORRENTINO, A., LIU, C., ADDARIO, A., PESCHLE, C., SCAMBIA, G. and FERLINI, C. (2008) Role of microRNAs in drug-resistant ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol*, **111**, 478-86.
- [86] CHEN, Y. and GORSKI, D.H. (2008) Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood*, **111**, 1217-26.
- [87] STRATHDEE, G., HOLYOAKE, T.L., SIM, A., PARKER, A., OSCIER, D.G., MELO, J.V., MEYER, S., EDEN, T., DICKINSON, A.M., MOUNTFORD, J.C., JORGENSEN, H.G., SOUTAR, R. and BROWN, R. (2007) Inactivation of HOXA genes by hypermethylation in myeloid and lymphoid malignancy is frequent and associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res*, **13**, 5048-55.
- [88] RAMAN, V., MARTENSEN, S.A., REISMAN, D., EVRON, E., ODENWALD, W.F., JAFFEE, E., MARKS, J. and SUKUMAR, S. (2000) Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature*, **405**, 974-8.
- [89] KIM, G.H., SAMANT, S.A., EARLEY, J.U. and SVENSSON, E.C. (2009) Translational control of FOG-2 expression in cardiomyocytes by microRNA-130a. *PLoS One*, **4**, e6161.
- [90] CHANG, T., YU, D., LEE, Y., WENTZEL, E.A., ARKING, D.E., WEST, K.M., DANG, C.V., THOMAS-TIKHONENKO, A. and MENDELL, J.T. (2008) Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet*, **40**, 43-50.
- [91] LEE, K., LOTTERMAN, C., KARIKARI, C., OMURA, N., FELDMANN, G., HABBE, N., GOGGINS, M.G., MENDELL, J.T. and MAITRA, A. (2009) Epigenetic silencing of MicroRNA miR-107

- regulates cyclin-dependent kinase 6 expression in pancreatic cancer. *Pancreatology*, **9**, 293-301.
- [92] WANG, H., GARZON, R., SUN, H., LADNER, K.J., SINGH, R., DAHLMAN, J., CHENG, A., HALL, B.M., QUALMAN, S.J., CHANDLER, D.S., CROCE, C.M. and GUTTRIDGE, D.C. (2008) NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell*, **14**, 369-81.
- [93] MALUMBRES, R., SAROSIEK, K.A., CUBEDO, E., RUIZ, J.W., JIANG, X., GASCOYNE, R.D., TIBSHIRANI, R. and LOSSOS, I.S. (2009) Differentiation stage-specific expression of microRNAs in B lymphocytes and diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, **113**, 3754-64.
- [94] ZANETTE, D.L., RIVADAVIA, F., MOLFETTA, G.A., BARBUZANO, F.G., PROTO-SIQUEIRA, R. and SILVA-JR, W.A. (2007) miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. *Braz J Med Biol Res*, **40**, 1435-40.
- [95] CALIN, G.A., PEKARSKY, Y. and CROCE, C.M. (2007) The role of microRNA and other non-coding RNA in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*, **20**, 425-37.
- [96] STAMATOPOULOS, B., MEULEMAN, N., HAIBE-KAINS, B., SAUSSOY, P., VAN DEN NESTE, E., MICHAUX, L., HEIMANN, P., MARTIAT, P., BRON, D. and LAGNEAUX, L. (2009) microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification. *Blood*, **113**, 5237-45.
- [97] WAGNER, W., HORN, P., CASTOLDI, M., DIEHLMANN, A., BORK, S., SAFFRICH, R., BENES, V., BLAKE, J., PFISTER, S., ECKSTEIN, V. and HO, A.D. (2008) Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One*, **3**, e2213.
- [98] GARZON, R., GAROFALO, M., MARTELLI, M.P., BRIESEWITZ, R., WANG, L., FERNANDEZ-CYMERING, C., VOLINIA, S., LIU, C.G., SCHNITTGER, S., HAERLACH, T., LISO, A., DIVERIO, D., MANCINI, M., MELONI, G., FOA, R., MARTELLI, M.F., MECUCCI, C., CROCE, C.M. and FALI, (2008) Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 3945-50.
- [99] BICHI, R., SHINTON, S.A., MARTIN, E.S., KOVAL, A., CALIN, G.A., CESARI, R., RUSSO, G., HARDY, R.R. and CROCE, C.M. (2002) Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 6955-60.
- [100] BYRD, J.C., MROZEK, K., DODGE, R.K., CARROLL, A.J., EDWARDS, C.G., ARTHUR, D.C., PETTENATI, M.J., PATIL, S.R., RAO, K.W., WATSON, M.S., KODURU, P.R.K., MOORE, J.O., STONE, R.M. and MAYER, (2002) Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*, **100**, 4325-36.
- [101] MOTT, J.L., KOBAYASHI, S., BRONK, S.F. and GORES, G.J. (2007) mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene*, **26**, 6133-40.
- [102] PARK, S., LEE, J.H., HA, M., NAM, J. and KIM, V.N. (2009) miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 23-9.
- [103] XU, H., CHEUNG, I.Y., GUO, H. and CHEUNG, N.V. (2009) MicroRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: Potenzial implications for immune based therapy of human solid tumors. *Cancer Res*, **69**, 6275-81.
- [104] FABBRI, M., GARZON, R., CIMMINO, A., LIU, Z., ZANESI, N., CALLEGARI, E., LIU, S., ALDER, H., COSTINEAN, S., FERNANDEZ-CYMERING, C., VOLINIA, S., GULER, G., MORRISON, C.D., CHAN, K.K. and MARCUCCI, (2007) MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 15805-10.
- [105] GEBESHUBER, C.A., ZATLOUKAL, K. and MARTINEZ, J. (2009) miR-29a suppresses tristetraprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis. *EMBO Rep*, **10**, 400-5.
- [106] ZHOU, B., WANG, S., MAYR, C., BARTEL, D.P. and LODISH, H.F. (2007) miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 7080-5.

- [107] XIAO, C., CALADO, D.P., GALLER, G., THAI, T., PATTERSON, H.C., WANG, J., RAJEWSKY, N., BENDER, T.P. and RAJEWSKY, K. (2007) MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell*, **131**, 146-59.
- [108] TAN, L.P., WANG, M., ROBERTUS, J., SCHAKEL, R.N., GIBBUS, J.H., DIEPSTRA, A., HARMS, G., PEH, S., REIJMERS, R.M., PALS, S.T., KROESEN, B., KLUIN, P.M., POPPEMA, S. and VAN DEN BERG, A. (2009) miRNA profiling of B-cell subsets: specific miRNA profile for germinal center B cells with variation between centroblasts and centrocytes. *Lab Invest*, **89**, 708-16.
- [109] WU, H., NEILSON, J.R., KUMAR, P., MANOCHA, M., SHANKAR, P., SHARP, P.A. and MANJUNATH, N. (2007) miRNA Profiling of Naive, Effector and Memory CD8 T Cells. *PLoS ONE*, **2**, e1020.
- [110] COBB, B.S., HERTWECK, A., SMITH, J., O'CONNOR, E., GRAF, D., COOK, T., SMALE, S.T., SAKAGUCHI, S., LIVESEY, F.J., FISHER, A.G. and MERKENSCHLAGER, M. (2006) A role for Dicer in immune regulation. *J Exp Med*, **203**, 2519-27.
- [111] LU, J., GUO, S., EBERT, B.L., ZHANG, H., PENG, X., BOSCO, J., PRETZ, J., SCHLANGER, R., WANG, J.Y., MAK, R.H., DOMBKOWSKI, D.M., PREFFER, F.I., SCADDEN, D.T. and GOLUB, T.R. (2008) MicroRNA-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors. *Dev Cell*, **14**, 843-53.
- [112] HUSSEIN, K., THEOPHILE, K., BUSCHE, G., SCHLEGELBERGER, B., GOHRING, G., KREIPE, H. and BOCK, O. (2009) Significant inverse correlation of microRNA-150/MYB and microRNA-222/p27 in myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*.
- [113] FULCI, V., CHIARETTI, S., GOLDONI, M., AZZALIN, G., CARUCCI, N., TAVOLARO, S., CASTELLANO, L., MAGRELLI, A., CITARELLA, F., MESSINA, M., MAGGIO, R., PERAGINE, N., SANTANGELO, S. and MAURO, F. (2007) Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **109**, 4944-51.
- [114] WANG, M., TAN, L.P., DIJKSTRA, M.K., VAN LOM, K., ROBERTUS, J., HARMS, G., BLOKZIIL, T., KOOISTRA, K., VAN T'VEER, M.B., ROSATI, S., VISSER, L., JONGEN-LAVRENCIC, M., KLUIN, P.M. and VAN DEN BERG, A. (2008) miRNA analysis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: proliferation centres characterized by low miR-150 and high BIC/miR-155 expression. *J Pathol*, **215**, 13-20.
- [115] GIBBUS, J.H., TAN, L.P., HARMS, G., SCHAKEL, R.N., DE JONG, D., BLOKZIIL, T., MOLLER, P., POPPEMA, S., KROESEN, B. and VAN DEN BERG, A. (2009) Hodgkin lymphoma cell lines are characterized by a specific miRNA expression profile. *Neoplasia*, **11**, 167-76.
- [116] BARROGA, C.F., PHAM, H. and KAUSHANSKY, K. (2008). Thrombopoietin regulates c-Myb expression by modulating micro RNA 150 expression. *Exp Hematol*, **36**, 1585-92.
- [117] OVCHARENKO, D., KELNAR, K., JOHNSON, C., LENG, N. and BROWN, D. (2007) Genome-scale microRNA and small interfering RNA screens identify small RNA modulators of TRAIL-induced apoptosis pathway. *Cancer Res*, **67**, 10782-8.
- [118] ZHOU, L., QI, X., POTASHKIN, J.A., ABDUL-KARIM, F.W. and GORODESKI, G.I. (2008) MicroRNAs miR-186 and miR-150 down-regulate expression of the pro-apoptotic purinergic P2X7 receptor by activation of instability sites at the 3'-untranslated region of the gene that decrease steady-state levels of the transcript. *J Biol Chem*, **283**, 28274-86.
- [119] O'DONNELL, K.A., WENTZEL, E.A., ZELLER, K.I., DANG, C.V. and MENDELL, J.T. (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, **435**, 839-43.
- [120] SYLVESTRE, Y., DE GUIRE, V., QUERIDO, E., MUKHOPADHYAY, U.K., BOURDEAU, V., MAJOR, F., FERBEYRE, G. and CHARTRAND, P. (2007) An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J Biol Chem*, **282**, 2135-43.
- [121] LIU, W., YEH, S., LU, C., YU, S., CHEN, H., LIN, C., CHEN, D. and CHEN, P. (2009) MicroRNA-18a prevents estrogen receptor- α expression, promoting proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Gastroenterology*, **136**, 683-93.

- [122] GUO, J., MIAO, Y., XIAO, B., HUAN, R., JIANG, Z., MENG, D. and WANG, Y. (2009) Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus non-tumorous tissues. *J Gastroenterol Hepatol*, **24**, 652-7.
- [123] OTAEGUI, D., BARANZINI, S.E., ARMANANZAS, R., CALVO, B., MUNOZ-CULLA, M., KHANKHANIAN, P., INZA, I., LOZANO, J.A., CASTILLO-TRIVINO, T., ASENSIO, A., OLASKOAGA, J. and DE MUNAIN, A.L. (2009) Differential micro RNA expression in PBMC from multiple sclerosis patients. *PLoS One*, **4**, e6309.
- [124] POGRIBNY, I.P., MUSKHELISHVILI, L., TRYNDYAK, V.P. and BELAND, F.A. (2009) The tumor-promoting activity of 2-acetylaminofluorene is associated with disruption of the p53 signaling pathway and the balance between apoptosis and cell proliferation. *Toxicol Appl Pharmacol*, **235**, 305-11.
- [125] KASASHIMA, K., NAKAMURA, Y. and KOZU, T. (2004) Altered expression profiles of microRNAs during TPA-induced differentiation of HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **322**, 403-10.
- [126] UCHIDA, S., NISHIDA, A., HARA, K., KAMEMOTO, T., SUETSUGI, M., FUJIMOTO, M., WATANUKI, T., WAKABAYASHI, Y., OTSUKI, K., MCEWEN, B.S. and WATANABE, Y. (2008) Characterization of the vulnerability to repeated stress in Fischer 344 rats: possible involvement of microRNA-mediated down-regulation of the glucocorticoid receptor. *Eur J Neurosci*, **27**, 2250-61.
- [127] VREUGDENHIL, E., VERISSIMO, C.S.L., MARIMAN, R., KAMPHORST, J.T., BARBOSA, J.S., ZWEERS, T., CHAMPAGNE, D.L., SCHOUTEN, T., MEIJER, O.C., DE KLOET, E.R. and FITZSIMONS, C.P. (2009) MicroRNA 18 and 124a down-regulate the glucocorticoid receptor: implications for glucocorticoid responsiveness in the brain. *Endocrinology*, **150**, 2220-8.
- [128] OHGAWARA, T., KUBOTA, S., KAWAKI, H., KONDO, S., EGUCHI, T., KURIO, N., AOYAMA, E., SASAKI, A. and TAKIGAWA, M. (2009) Regulation of chondrocytic phenotype by micro RNA 18a: involvement of Ccn2/Ctgf as a major target gene. *FEBS Lett*, **583**, 1006-10.
- [129] BEN-AMI, O., PENCOVICH, N., LOTEM, J., LEVANON, D. and GRONER, Y. (2009) A regulatory interplay between miR-27a and Runx1 during megakaryopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 238-43.
- [130] NA, Y.J., SUNG, J.H., LEE, S.C., LEE, Y.J., CHOI, Y.J., PARK, W.Y., SHIN, H.S. and KIM, J.H. (2009) Comprehensive analysis of microRNA-mRNA co-expression in circadian rhythm. *Exp Mol Med*, **41**, 638-47.
- [131] XI, Y., FORMENTINI, A., CHIEN, M., WEIR, D.B., RUSSO, J.J., JU, J., KORNMANN, M. and JU, J. (2006) Prognostic Values of microRNAs in Colorectal Cancer. *Biomark Insights*, **2**, 113-121.
- [132] HUI, A.B.Y., SHI, W., BOUTROS, P.C., MILLER, N., PINTILIE, M., FYLES, T., MCCREADY, D., WONG, D., GERSTER, K., WALDRON, L., JURISICA, I., PENN, L.Z. and LIU, F. (2009) Robust global micro-RNA profiling with formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer tissues. *Lab Invest*, **89**, 597-606.
- [133] CHENG, A.M., BYROM, M.W., SHELTON, J. and FORD, L.P. (2005) Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res*, **33**, 1290-7.
- [134] HAASCH, D., CHEN, Y., REILLY, R.M., CHIOU, X.G., KOTERSKI, S., SMITH, M.L., KROEGER, P., MCWEENY, K., HALBERT, D.N., MOLLISON, K.W., DJURIC, S.W. and TREVILLYAN, J.M. (2002) T cell activation induces a noncoding RNA transcript sensitive to inhibition by immunosuppressant drugs and encoded by the proto-oncogene, BIC. *Cell Immunol*, **217**, 78-86.
- [135] THAI, T., CALADO, D.P., CASOLA, S., ANSEL, K.M., XIAO, C., XUE, Y., MURPHY, A., FRENDEWEY, D., VALENZUELA, D., KUTOK, J.L., SCHMIDT-SUPPRIAN, M., RAJEWSKY, N., YANCOPOULOS, G., RAO, A. and RAJEWSK, (2007) Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science*, **316**, 604-8.
- [136] O'CONNELL, R.M., TAGANOV, K.D., BOLDIN, M.P., CHENG, G. and BALTIMORE, D. (2007)

- MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 1604-9.
- [137] TAGANOV, K.D., BOLDIN, M.P., CHANG, K. and BALTIMORE, D. (2006) NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 12481-6.
- [138] KLUIVER, J., VAN DEN BERG, A., DE JONG, D., BLOKZIIL, T., HARMS, G., BOUWMAN, E., JACOBS, S., POPPEMA, S. and KROESEN, B. (2007) Regulation of pri-microRNA BIC transcription and processing in Burkitt lymphoma. *Oncogene*, **26**, 3769-76.
- [139] YIN, Q., MCBRIDE, J., FEWELL, C., LACEY, M., WANG, X., LIN, Z., CAMERON, J. and FLEMINGTON, E.K. (2008) MicroRNA-155 is an Epstein-Barr virus-induced gene that modulates Epstein-Barr virus-regulated gene expression pathways. *J Virol*, **82**, 5295-306.
- [140] JIANG, J., LEE, E.J. and SCHMITTGEN, T.D. (2006) Increased expression of microRNA-155 in Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*, **45**, 103-6.
- [141] EIS, P.S., TAM, W., SUN, L., CHADBURN, A., LI, Z., GOMEZ, M.F., LUND, E. and DAHLBERG, J.E. (2005) Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 3627-32.
- [142] KLUIVER, J., POPPEMA, S., DE JONG, D., BLOKZIIL, T., HARMS, G., JACOBS, S., KROESEN, B. and VAN DEN BERG, A. (2005) BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol*, **207**, 243-9.
- [143] KLUIVER, J., HARALAMBIEVA, E., DE JONG, D., BLOKZIIL, T., JACOBS, S., KROESEN, B., POPPEMA, S. and VAN DEN BERG, A. (2006) Lack of BIC and microRNA miR-155 expression in primary cases of Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, **45**, 147-53.
- [144] RODRIGUEZ, A., VIGORITO, E., CLARE, S., WARREN, M.V., COUTTET, P., SOOND, D.R., VAN DONGEN, S., GROCOCK, R.J., DAS, P.P., MISKA, E.A., VETRIE, D., OKKENHAUG, K., ENRIGHT, A.J., DOUGAN, G. and TURNER, (2007) Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*, **316**, 608-11.
- [145] O'CONNELL, R.M., RAO, D.S., CHAUDHURI, A.A., BOLDIN, M.P., TAGANOV, K.D., NICOLL, J., PAQUETTE, R.L. and BALTIMORE, D. (2008) Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med*, **205**, 585-94.
- [146] COSTINEAN, S., ZANESI, N., PEKARSKY, Y., TILI, E., VOLINIA, S., HEEREMA, N. and CROCE, C.M. (2006) Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7024-9.
- [147] VIGORITO, E., PERKS, K.L., ABREU-GOODGER, C., BUNTING, S., XIANG, Z., KOHLHAAS, S., DAS, P.P., MISKA, E.A., RODRIGUEZ, A., BRADLEY, A., SMITH, K.G.C., RADA, C., ENRIGHT, A.J., TOELLNER, K. and MACLENNAN, (2007) microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity*, **27**, 847-59.
- [148] DORSETT, Y., MCBRIDE, K.M., JANKOVIC, M., GAZUMYAN, A., THAI, T., ROBBIANI, D.F., DI VIRGILIO, M., SAN-MARTIN, B.R., HEIDKAMP, G., SCHWICKERT, T.A., EISENREICH, T., RAJEWSKY, K. and NUSSENZWEIG, M.C. (2008) MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation. *Immunity*, **28**, 630-8.
- [149] TENG, G., HAKIMPOUR, P., LANDGRAF, P., RICE, A., TUSCHL, T., CASELLAS, R. and PAPAVALIOU, F.N. (2008) MicroRNA-155 is a negative regulator of activation-induced cytidine deaminase. *Immunity*, **28**, 621-9.
- [150] COSTINEAN, S., SANDHU, S.K., PEDERSEN, I.M., TILI, E., TROTTA, R., PERROTTI, D., CIARLARIELLO, D., NEVIANI, P., HARB, J., KAUFFMAN, L.R., SHIDHAM, A. and CROCE, C.M. (2009) Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase and CCAAT enhancer-binding protein beta are targeted by miR-155 in B cells of Emicro-MiR-155 transgenic mice. *Blood*, **114**, 1374-82.
- [151] HE, L., HE, X., LIM, L.P., DE STANCHINA, E., XUAN, Z., LIANG, Y., XUE, W., ZENDER, L., MAGNUS, J., RIDZON, D., JACKSON, A.L., LINSLEY, P.S., CHEN, C., LOWE, S.W., CLEARY, M.A. and

- HANNON, G.J. (2007) A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, **447**, 1130-4.
- [152] RAVER-SHAPIRA, N., MARCIANO, E., MEIRI, E., SPECTOR, Y., ROSENFELD, N., MOSKOVITS, N., BENTWICH, Z. and OREN, M. (2007) Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell*, **26**, 731-43.
- [153] TARASOV, V., JUNG, P., VERDOODT, B., LODYGIN, D., EPANCHINTSEV, A., MENSSSEN, A., MEISTER, G. and HERMEKING, H. (2007) Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle*, **6**, 1586-93.
- [154] KUMAMOTO, K., SPILLARE, E.A., FUJITA, K., HORIKAWA, I., YAMASHITA, T., APPELLA, E., NAGASHIMA, M., TAKENOSHITA, S., YOKOTA, J. and HARRIS, C.C. (2008) Nutlin-3a activates p53 to both down-regulate inhibitor of growth 2 and up-regulate mir-34a, mir-34b, and mir-34c expression, and induce senescence. *Cancer Res*, **68**, 3193-203.
- [155] FLECKENSTEIN, D.S., UPHOFF, C.C., DREXLER, H.G. and QUENTMEIER, H. (2002) Detection of p53 gene mutations by single strand conformational polymorphism (SSCP) in human acute myeloid leukemia-derived cell lines. *Leuk Res*, **26**, 207-14.
- [156] LODYGIN, D., TARASOV, V., EPANCHINTSEV, A., BERKING, C., KNYAZEVA, T., KORNER, H., KNYAZEV, P., DIEBOLD, J. and HERMEKING, H. (2008) Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle*, **7**, 2591-600.
- [157] ROMAN-GOMEZ, J., AGIRRE, X., JIMENEZ-VELASCO, A., ARQUEROS, V., VILAS-ZORNOZA, A., RODRIGUEZ-OTERO, P., MARTIN-SUBERO, I., GARATE, L., CORDEU, L., SAN JOSE-ENERIZ, E., MARTIN, V., CASTILLEJO, J.A. and BANDRES, E. (2009) Epigenetic regulation of microRNAs in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, **27**, 1316-22.
- [158] DIJKSTRA, M.K., VAN LOM, K., TIELEMANS, D., ELSTRODT, F., LANGERAK, A.W., VAN 'T VEER, M.B. and JONGEN-LAVRENCIC, M. (2009) 17p13/TP53 deletion in B-CLL patients is associated with microRNA-34a downregulation. *Leukemia*, **23**, 625-7.
- [159] ZENZ, T., MOHR, J., ELDERING, E., KATER, A.P., BUHLER, A., KIENLE, D., WINKLER, D., DURIG, J., VAN OERS, M.H.J., MERTENS, D., DOHNER, H. and STILGENBAUER, S. (2009) miR-34a as part of the resistance network in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **113**, 3801-8.
- [160] HASHIMI, S.T., FULCHER, J.A., CHANG, M.H., GOV, L., WANG, S. and LEE, B. (2009) MicroRNA profiling identifies miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1 and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation. *Blood*, **114**, 404-14.
- [161] YAMAKUCHI, M., FERLITO, M. and LOWENSTEIN, C.J. (2008) miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 13421-6.
- [162] SUN, F., FU, H., LIU, Q., TIE, Y., ZHU, J., XING, R., SUN, Z. and ZHENG, X. (2008) Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest. *FEBS Lett*, **582**, 1564-8.
- [163] TRYNDYAK, V.P., ROSS, S.A., BELAND, F.A. and POGRIBNY, I.P. (2009) Down-regulation of the microRNAs miR-34a, miR-127, and miR-200b in rat liver during hepatocarcinogenesis induced by a methyl-deficient diet. *Mol Carcinog*, **48**, 479-87.
- [164] SMIRNOVA, L., GRAFE, A., SEILER, A., SCHUMACHER, S., NITSCH, R. and WULCZYN, F.G. (2005) Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci*, **21**, 1469-77.
- [165] LUKIW, W.J. (2007) Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport*, **18**, 297-300.
- [166] SABA, R., GOODMAN, C.D., HUZAREWICH, R.L.C.H., ROBERTSON, C. and BOOTH, S.A. (2008) A miRNA signature of prion induced neurodegeneration. *PLoS One*, **3**, e3652.
- [167] FOEKENS, J.A., SIEUWERTS, A.M., SMID, M., LOOK, M.P., DE WEERD, V., BOERSMA, A.W.M., KLIJN, J.G.M., WIEMER, E.A.C. and MARTENS, J.W.M. (2008) Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer. *Proc*

Natl Acad Sci U S A, **105**, 13021-6.

[168] MARCUCCI, G., RADMACHER, M.D., MAHARRY, K., MROZEK, K., RUPPERT, A.S., PASCHKA, P., VUKOSAVLJEVIC, T., WHITMAN, S.P., BALDUS, C.D., LANGER, C., LIU, C., CARROLL, A.J., POWELL, B.L. and GARZON, R. (2008) MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, **358**, 1919-28.

[169] MI, S., LU, J., SUN, M., LI, Z., ZHANG, H., NEILLY, M.B., WANG, Y., QIAN, Z., JIN, J., ZHANG, Y., BOHLANDER, S.K., LE BEAU, M.M., LARSON, R.A., GOLUB, T.R., ROWLEY, J.D. and CHEN, J. (2007) MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 19971-6.

[170] KOTANI, A., HA, D., HSIEH, J., RAO, P.K., SCHOTTE, D., DEN BOER, M.L., ARMSTRONG, S.A. and LODISH, H.F. (2009) miR-128b is a potent glucocorticoid sensitizer in MLL-AF4 acute lymphocytic leukemia cells and exerts cooperative effects with miR-221. *Blood*, **114**, 4169-78.

[171] GODLEWSKI, J., NOWICKI, M.O., BRONISZ, A., WILLIAMS, S., OTSUKI, A., NUOVO, G., RAYCHAUDHURY, A., NEWTON, H.B., CHIOCCA, E.A. and LAWLER, S. (2008) Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res*, **68**, 9125-30.

[172] RAAPHORST, F.M. (2003) Self-renewal of hematopoietic and leukemic stem cells: a central role for the Polycomb-group gene Bmi-1. *Trends Immunol*, **24**, 522-4.

[173] KULSHRESHTHA, R., FERRACIN, M., WOJCIK, S.E., GARZON, R., ALDER, H., AGOSTO-PEREZ, F.J., DAVULURI, R., LIU, C., CROCE, C.M., NEGRINI, M., CALIN, G.A. and IVAN, M. (2007) A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol*, **27**, 1859-67.

[174] GIANNAKAKIS, A., SANDALTZOPOULOS, R., GRESHOCK, J., LIANG, S., HUANG, J., HASEGAWA, K., LI, C., O'BRIEN-JENKINS, A., KATSAROS, D., WEBER, B.L., SIMON, C., COUKOS, G. and ZHANG, L. (2008) miR-210 links hypoxia with cell cycle regulation and is deleted in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Biol Ther*, **7**, 255-64.

[175] CAMPS, C., BUFFA, F.M., COLELLA, S., MOORE, J., SOTIRIOU, C., SHELDON, H., HARRIS, A.L., GLEADLE, J.M. and RAGOISSIS, J. (2008) hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clin Cancer Res*, **14**, 1340-8.

[176] LAWRIE, C.H., GAL, S., DUNLOP, H.M., PUSHKARAN, B., LIGGINS, A.P., PULFORD, K., BANHAM, A.H., PEZZELLA, F., BOULTWOOD, J., WAINSCOAT, J.S., HATTON, C.S.R. and HARRIS, A.L. (2008) Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*, **141**, 672-5.

[177] FASANARO, P., D'ALESSANDRA, Y., DI STEFANO, V., MELCHIONNA, R., ROMANI, S., POMPILIO, G., CAPOGROSSI, M.C. and MARTELLI, F. (2008) MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem*, **283**, 15878-83.

[178] MAKEYEV, E.V., ZHANG, J., CARRASCO, M.A. and MANIATIS, T. (2007) The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell*, **27**, 435-48.

[179] CHENG, L., PASTRANA, E., TAVAZOIE, M. and DOETSCH, F. (2009) miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nat Neurosci*, **12**, 399-408.

[180] AGIRRE, X., VILAS-ZORNOZA, A., JIMENEZ-VELASCO, A., MARTIN-SUBERO, J.I., CORDEU, L., GARATE, L., SAN JOSE-ENERIZ, E., ABIZANDA, G., RODRIGUEZ-OTERO, P., FORTES, P., RIFON, J., BANDRES, E., CALASANZ, M.J. and M, (2009) Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*, **69**, 4443-53.

[181] YOO, A.S., STAAHL, B.T., CHEN, L. and CRABTREE, G.R. (2009) MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development. *Nature*, **460**, 642-6.

[182] HACKANSON, B., BENNETT, K.L., BRENA, R.M., JIANG, J., CLAUS, R., CHEN, S., BLAGITKO-

- DORFS, N., MAHARRY, K., WHITMAN, S.P., SCHMITTGEN, T.D., LUBBERT, M., MARCUCCI, G., BLOOMFIELD, C.D. and PLASS, C. (2008) Epigenetic modification of CCAAT/enhancer binding protein alpha expression in acute myeloid leukemia. *Cancer Res*, **68**, 3142-51.
- [183] YANG, H., KONG, W., HE, L., ZHAO, J., O'DONNELL, J.D., WANG, J., WENHAM, R.M., COPPOLA, D., KRUK, P.A., NICOSIA, S.V. and CHENG, J.Q. (2008) MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res*, **68**, 425-33.
- [184] LEE, Y., BANTOUNAS, I., LEE, D., PHYLACTOU, L., CALDWELL, M.A. and UNEY, J.B. (2009) Twist-1 regulates the miR-199a/214 cluster during development. *Nucleic Acids Res*, **37**, 123-8.
- [185] MOSCHOS, S.A., WILLIAMS, A.E., PERRY, M.M., BIRRELL, M.A., BELVISI, M.G. and LINDSAY, M.A. (2007) Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids. *BMC Genomics*, **8**, 240.
- [186] LI, N., FLYNT, A.S., KIM, H.R., SOLNICA-KREZEL, L. and PATTON, J.G. (2008) Dispatched Homolog 2 is targeted by miR-214 through a combination of three weak microRNA recognition sites. *Nucleic Acids Res*, **36**, 4277-85.
- [187] GAO, J., GRAVES, S., KOCH, U., LIU, S., JANKOVIC, V., BUONAMICI, S., EL ANDALOUSSI, A., NIMER, S.D., KEE, B.L., TAICHMAN, R., RADTKE, F. and AIFANTIS, I. (2009) Hedgehog signaling is dispensable for adult hematopoietic stem cell function. *Cell Stem Cell*, **4**, 548-58.
- [188] POPOVIC, R., RIESBECK, L.E., VELU, C.S., CHAUBEY, A., ZHANG, J., ACHILLE, N.J., ERFURTH, F.E., EATON, K., LU, J., GRIMES, H.L., CHEN, J., ROWLEY, J.D. and ZELEZNIK-LE, N.J. (2009) Regulation of mir-196b by MLL and its overexpression by MLL fusions contributes to immortalization. *Blood*, **113**, 3314-22.
- [189] ENVER, T. and GREAVES, M. (1998) Loops, lineage, and leukemia. *Cell*, **94**, 9-12.
- [190] NAGATA, Y., MAESAWA, C., TADA, H., TAKIKAWA, Y., YASHIMA-ABO, A. and MASUDA, T. (2009) Differential microRNA expression between bone marrow side population cells and hepatocytes in adult mice. *Int J Mol Med*, **24**, 35-43.
- [191] RAMKISSOON, S.H., MAINWARING, L.A., OGASAWARA, Y., KEYVANFAR, K., MCCOY, J.P.J., SLOAND, E.M., KAJIGAYA, S. and YOUNG, N.S. (2006) Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. *Leuk Res*, **30**, 643-7.
- [192] MERKEROVA, M., BELICKOVA, M. and BRUCHOVA, H. (2008) Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. *Eur J Haematol*, **81**, 304-10.
- [193] YUAN, W., SUN, W., YANG, S., DU, J., ZHAI, C., WANG, Z., ZHANG, J. and ZHU, T. (2008) Downregulation of microRNA-142 by proto-oncogene LMO2 and its co-factors. *Leukemia*, **22**, 1067-71.
- [194] YAMADA, Y., WARREN, A.J., DOBSON, C., FORSTER, A., PANNELL, R. and RABBITTS, T.H. (1998) The T cell leukemia LIM protein Lmo2 is necessary for adult mouse hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3890-5.
- [195] WADMAN, I.A., OSADA, H., GRUTZ, G.G., AGULNICK, A.D., WESTPHAL, H., FORSTER, A. and RABBITTS, T.H. (1997) The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J*, **16**, 3145-57.
- [196] FELLI, N., PEDINI, F., ROMANIA, P., BIFFONI, M., MORSILLI, O., CASTELLI, G., SANTORO, S., CHICARELLA, S., SORRENTINO, A., PESCHLE, C. and MARZIALI, G. (2009) MicroRNA 223-dependent expression of LMO2 regulates normal erythropoiesis. *Haematologica*, **94**, 479-86.
- [197] JOHNNIDIS, J.B., HARRIS, M.H., WHEELER, R.T., STEHLING-SUN, S., LAM, M.H., KIRAK, O., BRUMMELKAMP, T.R., FLEMING, M.D. and CAMARGO, F.D. (2008) Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*, **451**, 1125-9.
- [198] SAUER, S., BRUNO, L., HERTWECK, A., FINLAY, D., LELEU, M., SPIVAKOV, M., KNIGHT, Z.A., COBB, B.S., CANTRELL, D., O'CONNOR, E., SHOKAT, K.M., FISHER, A.G. and MERKENSCHLAGER, M.

- (2008) T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 7797-802.
- [199] HUANG, B., ZHAO, J., LEI, Z., SHEN, S., LI, D., SHEN, G., ZHANG, G. and FENG, Z. (2009) miR-142-3p restricts cAMP production in CD4+CD25- T cells and CD4+CD25+ TREG cells by targeting AC9 mRNA. *EMBO Rep*, **10**, 180-5.
- [200] SCHOTTE, D., CHAU, J.C., SYLVESTER, G., LIU, G., CHEN, C., VAN, d.e.r., V.e.l.d.e.n., V.H., BROEKHUIS, M.J., PETERS, T.C., PIETERS, R. and BOE, (2008) Identification of new microRNA genes and aberrant microRNA profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **23**, 313-22.
- [201] BRACHT, K., KIEFER, T., DOLKEN, G. and BEDNARSKI, P.J. (2007) Characterization of three B-cell lymphoma cell lines from chemotherapy resistant patients with respect to in vitro sensitivity to 21 antitumor agents, ABC-transporter expression and cellular redox status. *J Cancer Res Clin Oncol*, **133**, 957-67.
- [202] KIEFER, T., SCHULER, F., KNOPP, A., WIMMER, M., HIRT, C., SCHAEFER, H. and DOLKEN, G. (2007) A human Burkitt's lymphoma cell line carrying t(8;22) and t(14;18) translocations. *Ann Hematol*, **86**, 821-30.
- [203] FALINI, B., MECUCCI, C., TIACCI, E., ALCALAY, M., ROSATI, R., PASQUALUCCI, L., LA STARZA, R., DIVERIO, D., COLOMBO, E., SANTUCCI, A., BIGERNA, B., PACINI, R., PUCCIARINI, A. and LISO, A. (2005) Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*, **352**, 254-66.
- [204] GEORGANTAS, R.W., 3.r.d., HILDRETH, R., MORISOT, S., ALDER, J., LIU, C.G., HEIMFELD, S., CALIN, G.A., CROCE, C.M. and CIVIN, C.I. (2007) CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: A circuit diagram of differentiation control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 2750-5.
- [205] CHOONG, M.L., YANG, H.H. and MCNIECE, I. (2007) MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis. *Exp Hematol*, **35**, 551-64.
- [206] ZHAN, M., MILLER, C.P., PAPAYANNOPOULOU, T., STAMATOYANNOPOULOS, G. and SONG, C. (2007) MicroRNA expression dynamics during murine and human erythroid differentiation. *Exp Hematol*, **35**, 1015-25.
- [207] MASAKI, S., OHTSUKA, R., ABE, Y., MUTA, K. and UMEMURA, T. (2007) Expression patterns of microRNAs 155 and 451 during normal human erythropoiesis. *Biochem Biophys Res Commun*, **364**, 509-14.
- [208] NAGUIBNEVA, I., AMEYAR-ZAZOUA, M., POLESSKAYA, A., AIT-SI-ALI, S., GROISMAN, R., SOUIDI, M., CUVELLIER, S. and HAREL-BELLAN, A. (2006) The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat Cell Biol*, **8**, 278-84.
- [209] SHEN, W.F., MONTGOMERY, J.C., ROZENFELD, S., MOSKOW, J.J., LAWRENCE, H.J., BUCHBERG, A.M. and LARGMAN, C. (1997) AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Mol Cell Biol*, **17**, 6448-58.
- [210] SPELEMAN, F., CAUWELIER, B., DASTUGUE, N., COOLS, J., VERHASSELT, B., POPPE, B., VAN ROY, N., VANDESOMPELE, J., GRAUX, C., UYTTEBROECK, A., BOOGAERTS, M., DE MOERLOOSE, B., BENOIT, Y., SELLESLAG, D., BILLIET, J., ROBERT, A., HUGUET, F., VANDENBERGHE, P. (2005) A new recurrent inversion, inv(7)(p15q34), leads to transcriptional activation of HOXA10 and HOXA11 in a subset of T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia*, **19**, 358-66.
- [211] GUIMARAES-STERNBERG, C., MEERSON, A., SHAKED, I. and SOREQ, H. (2006) MicroRNA modulation of megakaryoblast fate involves cholinergic signaling. *Leuk Res*, **30**, 583-95.
- [212] RAINER, J., PLONER, C., JESACHER, S., PLONER, A., EDUARDOFF, M., MANSHA, M., WASIM, M., PANZER-GRUMAYER, R., TRAJANOSKI, Z., NIEDEREGGER, H. and KOFLER, R. (2009) Glucocorticoid-regulated microRNAs and mirtrons in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **23**, 476-52.
- [213] GARDNER, J.P. and ZHANG, L. (1999) Glucocorticoid modulation of Ca²⁺ homeostasis in human B lymphoblasts. *J Physiol*, **514 (Pt 2)**, 385-96.

- [214] CUESTA, R., MARTINEZ-SANCHEZ, A. and GEBAUER, F. (2009) miR-181a regulates cap-dependent translation of p27(kip1) mRNA in myeloid cells. *Mol Cell Biol*, **29**, 2841-51.
- [215] ISKEN, F., STEFFEN, B., MERK, S., DUGAS, M., MARKUS, B., TIDOW, N., ZUHLSDORF, M., ILLMER, T., THIEDE, C., BERDEL, W.E., SERVE, H. and MULLER-TIDOW, C. (2008) Identification of acute myeloid leukaemia associated microRNA expression patterns. *Br J Haematol*, **140**, 153-61.
- [216] JONGEN-LAVRENCIC, M., SUN, S.M., DIJKSTRA, M.K., VALK, P.J. and LOWENBERG, B. (2008) MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood*, **111**, 5078-85.
- [217] NERLOV, C. (2004) C/EBPalpha mutations in acute myeloid leukaemias. *Nat Rev Cancer*, **4**, 394-400.
- [218] BIENZ, M., LUDWIG, M., LEIBUNDGUT, E.O., MUELLER, B.U., RATSCHILLER, D., SOLENTHALER, M., FEY, M.F. and PABST, T. (2005) Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin Cancer Res*, **11**, 1416-24.
- [219] LU, J., GETZ, G., MISKA, E.A., ALVAREZ-SAAVEDRA, E., LAMB, J., PECK, D., SWEET-CORDERO, A., EBERT, B.L., MAK, R.H., FERRANDO, A.A., DOWNING, J.R., JACKS, T., HORVITZ, H.R. and GOLUB, T.R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, **435**, 834-8.
- [220] ROSENFELD, N., AHARONOV, R., MEIRI, E., ROSENWALD, S., SPECTOR, Y., ZEPENIUK, M., BENJAMIN, H., SHABES, N., TABAK, S., LEVY, A., LEBANONY, D., GOREN, Y., SILBERSCHEIN, E., TARGAN, N., BEN-ARI, A., GILAD, S. (2008). MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol*, **26**, 462-9.
- [221] TANAKA, M., OIKAWA, K., TAKANASHI, M., KUDO, M., OHYASHIKI, J., OHYASHIKI, K. and KURODA, M. (2009) Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients. *PLoS One*, **4**, e5532.
- [222] SCHETTER, A.J., LEUNG, S.Y., SOHN, J.J., ZANETTI, K.A., BOWMAN, E.D., YANAIHARA, N., YUEN, S.T., CHAN, T.L., KWONG, D.L.W., AU, G.K.H., LIU, C., CALIN, G.A., CROCE, C.M. and HARRIS, C.C. (2008) MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA*, **299**, 425-36.
- [223] ESAU, C.C. (2008) Inhibition of microRNA with antisense oligonucleotides. *Methods*, **44**, 55-60.
- [224] VESTER, B. and WENGEL, J. (2004) LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry*, **43**, 13233-41.
- [225] OKAZAKI, K. and SAGATA, N. (1995) The Mos/MAP kinase pathway stabilizes c-Fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3 cells. *EMBO J*, **14**, 5048-59.
- [226] REDDY, R.K., LU, J. and LEE, A.S. (1999) The endoplasmic reticulum chaperone glycoprotein GRP94 with Ca(2+)-binding and antiapoptotic properties is a novel proteolytic target of calpain during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **274**, 28476-83.
- [227] BRUGAROLAS, J., LEI, K., HURLEY, R.L., MANNING, B.D., REILING, J.H., HAFEN, E., WITTERS, L.A., ELLISEN, L.W. and KAELIN, W.G.J. (2004) Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev*, **18**, 2893-904.
- [228] PETERSON, T.R., LAPLANTE, M., THOREEN, C.C., SANCAK, Y., KANG, S.A., KUEHL, W.M., GRAY, N.S. and SABATINI, D.M. (2009) DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*, **137**, 873-86.
- [229] taretscan 5.1: *Human CD4 3'UTR*. URL http://www.targetscan.org/cgi-bin/vert_50/view_gene.cgi?gs=CD4&taxid=9606&members=&showcnc=1&shownc=1. - 04.01.2010.
- [230] microCosm targets: *human CD4*. URL http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/cgi-bin/targets/v5/hit_list.pl?genome_id=2964&mirna_id=&external_name=CD4&gene_id=&go_class=function&go_term=&logic=phrase&terms=. - 04.01.2010.
- [231] Welcom Trust Sanger Institute: *Catalogue of Somatic mutations in PIK3CA*. URL

- <http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic?action=bygene&ln=PIK3CA&start=1&end=1069&coords=AA:AA>. - 05.01.2010.
- [232] Welcom Trust Sanger Institute: *Catalogue of Somatic mutations in Akt1*. URL <http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic?action=bygene&ln=AKT1&start=1&end=481&coords=AA:AA>.
- [233] TAMBURINI, J., ELIE, C., BARDET, V., CHAPUIS, N., PARK, S., BROET, P., CORNILLET-LEFEBVRE, P., LIOURE, B., UGO, V., BLANCHET, O., IFRAH, N., WITZ, F., DREYFUS, F., MAYEUX, P., LACOMBE, C. and BOUSCARY, D. (2007) Constitutive Phosphoinositide-3kinase/AKT activation represents a favourable prognostic factor in de novo AML patients. *Blood*, **110**, 1025-8.
- [234] VIRE, E., BRENNER, C., DEPLUS, R., BLANCHON, L., FRAGA, M., DIDELOT, C., MOREY, L., VAN EYNDE, A., BERNARD, D., VANDERWINDEN, J., BOLLEN, M., ESTELLER, M., DI CROCE, L., DE LAUNOIT, Y. and FUKS, F. (2006) The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*, **439**, 871-4.
- [235] MIYAZAKI, K., INOUE, H., ONAI, N., ISHIHARA, H. and KANNO, M. (2002) Chemokine-mediated thymopoiesis is regulated by a mammalian Polycomb group gene, mel-18. *Immunol Lett*, **80**, 139-43.
- [236] LIN, Y., DEVENEY, R., BARBARA, M., ISCOVE, N.N., NIMER, S.D., SLAPE, C. and APLAN, P.D. (2005) OLIG2 (BHLHB1), a bHLH transcription factor, contributes to leukemogenesis in concert with LMO1. *Cancer Res*, **65**, 7151-8.
- [237] WRITZL, K., CALE, C.M., PIERCE, C.M., WILSON, L.C. and HENNEKAM, R.C.M. (2007) Immunological abnormalities in CHARGE syndrome. *Eur J Med Genet*, **50**, 338-45.
- [238] WANG, J.W., HOWSON, J., HALLER, E. and KERR, W.G. (2001) Identification of a novel lipopolysaccharide-inducible gene with key features of both A kinase anchor proteins and chs1/beige proteins. *J Immunol*, **166**, 4586-95.
- [239] BARBAZUK, S.M. and GOLD, M.R. (1999) Protein kinase C-delta is a target of B-cell antigen receptor signaling. *Immunol Lett*, **69**, 259-67.
- [240] HARIGAE, H. (2006) GATA transcription factors and hematological diseases. *Tohoku J Exp Med*, **210**, 1-9.
- [241] GAL, H., PANDI, G., KANNER, A.A., RAM, Z., LITHWICK-YANAI, G., AMARIGLIO, N., RECHAVI, G. and GIVOL, D. (2008) MIR-451 and Imatinib mesylate inhibit tumor growth of Glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **376**, 86-90.
- [242] LARSSON, J. and KARLSSON, S. (2005) The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene*, **24**, 5676-92.
- [243] KOVALCHUK, O., FILKOWSKI, J., MESERVY, J., ILNYTSKYI, Y., TRYNDYAK, V.P., CHEKHUN, V.F. and POGRIBNY, I.P. (2008) Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin. *Mol Cancer Ther*, **7**, 2152-9.
- [244] BANDRES, E., BITARTE, N., ARIAS, F., AGORRETA, J., FORTES, P., AGIRRE, X., ZARATE, R., DIAZ-GONZALEZ, J.A., RAMIREZ, N., SOLA, J.J., JIMENEZ, P., RODRIGUEZ, J. and GARCIA-FONCILLAS, J. (2009) microRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells. *Clin Cancer Res*, **15**, 2281-90.
- [245] LEONARD, G.D., FOJO, T. and BATES, S.E. (2003) The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist*, **8**, 411-24.
- [246] BACH, J., RINN, B., MEYER, B., DODEL, R. and BACHER, M. (2008) Role of MIF in inflammation and tumorigenesis. *Oncology*, **75**, 127-33.
- [247] YAN, L., HUANG, X., SHAO, Q., HUANG, M., DENG, L., WU, Q., ZENG, Y. and SHAO, J. (2008) MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA*, **14**, 2348-60.
- [248] GUO, L., HUANG, Z., CHEN, X., DENG, Q., YAN, W., ZHOU, M., OU, C. and DING, Z. (2009). Differential expression profiles of microRNAs in NIH3T3 cells in response to UVB irradiation.

Photochem Photobio **85**, 765-73.

- [249] MAES, O.C., SAROJINI, H. and WANG, E. (2009) Stepwise up-regulation of MicroRNA expression levels from replicating to reversible and irreversible growth arrest states in WI-38 human fibroblasts. *J Cell Physiol*, **221**, 109-19.
- [250] HEZOVA, R., SLABY, O., FALTEJSKOVA, P., MIKULKOVA, Z., BURESOVA, I., RAJA, K.R., HODEK, J., OVESNA, J. and MICHALEK, J. (2009) microRNA-342, microRNA-191 and microRNA-510 are differentially expressed in T regulatory cells of type 1 diabetic patients. *Cell Immunol*, **260**, 70-4.
- [251] UNNO, K., ZHOU, Y., ZIMMERMAN, T., PLATANIAS, L.C. and WICKREMA, A. (2009) Identification of a novel microRNA cluster miR-193b-365 in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*, **50**, 1865-71.
- [252] XIE, H., LIM, B. and LODISH, H.F. (2009) MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity. *Diabetes*, **58**, 1050-7.
- [253] WILFRED, B.R., WANG, W. and NELSON, P.T. (2007) Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways. *Mol Genet Metab*, **91**, 209-17.
- [254] ILIOPOULOS, D., MALIZOS, K.N., OIKONOMOU, P. and TSEZOU, A. (2008) Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PLoS One*, **3**, e3740.
- [255] ROLDO, C., MISSIAGLIA, E., HAGAN, J.P., FALCONI, M., CAPELLI, P., BERSANI, S., CALIN, G.A., VOLINIA, S., LIU, C., SCARPA, A. and CROCE, C.M. (2006) MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol*, **24**, 4677-84.
- [256] GUO, Y., CHEN, Z., ZHANG, L., ZHOU, F., SHI, S., FENG, X., LI, B., MENG, X., MA, X., LUO, M., SHAO, K., LI, N., QIU, B., MITCHELSON, K., CHENG, J. and HE, J. (2008) Distinctive microRNA profiles relating to patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, **68**, 26-33.
- [257] KOZAKI, K., IMOTO, I., MOGI, S., OMURA, K. and INAZAWA, J. (2008) Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res*, **68**, 2094-105.
- [258] BAI, G., AMBALAVANAR, R., WEI, D. and DESSEM, D. (2007) Downregulation of selective microRNAs in trigeminal ganglion neurons following inflammatory muscle pain. *Mol Pain*, **3**, 15.
- [259] JONES, S.W., WATKINS, G., LE GOOD, N., ROBERTS, S., MURPHY, C.L., BROCKBANK, S.M.V., NEEDHAM, M.R.C., READ, S.J. and NEWHAM, P. (2009) The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF-alpha and MMP13. *Osteoarthritis Cartilage*, **17**, 464-72.
- [260] HU, G., ZHOU, R., LIU, J., GONG, A., EISCHEID, A.N., DITTMAN, J.W. and CHEN, X. (2009) MicroRNA-98 and let-7 confer cholangiocyte expression of cytokine-inducible Src homology 2-containing protein in response to microbial challenge. *J Immunol*, **183**, 1617-24.
- [261] HEBERT, C., NORRIS, K., SCHEPER, M.A., NIKITAKIS, N. and SAUK, J.J. (2007) High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer*, **6**, 5.
- [262] BHAT-NAKSHATRI, P., WANG, G., COLLINS, N.R., THOMSON, M.J., GEISTLINGER, T.R., CARROLL, J.S., BROWN, M., HAMMOND, S., SROUR, E.F., LIU, Y. and NAKSHATRI, H. (2009) Estradiol-regulated microRNAs control estradiol response in breast cancer cells. *Nucleic Acids Res*, **37**, 4850-61.
- [263] LEGESSE-MILLER, A., ELEMENTO, O., PFAU, S.J., FORMAN, J.J., TAVAZOIE, S. and COLLER, H.A. (2009) let-7 Overexpression leads to an increased fraction of cells in G2/M, direct down-regulation of Cdc34, and stabilization of Wee1 kinase in primary fibroblasts. *J Biol Chem*, **284**, 6605-9.
- [264] WANG, L., OBERG, A.L., ASMANN, Y.W., SICOTTE, H., McDONNELL, S.K., RISKA, S.M., LIU, W., STEER, C.J., SUBRAMANIAN, S., CUNNINGHAM, J.M., CERHAN, J.R. and THIBODEAU, S.N.

(2009) Genome-wide transcriptional profiling reveals microRNA-correlated genes and biological processes in human lymphoblastoid cell lines. *PLoS One*, **4**, e5878.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Biogenese der miRNAs.....	2
Abbildung 2: Sequenzen der miR-181-Familie.....	6
Abbildung 3: Struktur des LNA-modifizierten Ribosemoleküls.....	17
Abbildung 4: Schematischer Ablauf der Reversen Transkription der miRNAs.....	19
Abbildung 5: Normalisierung der Microarray-Slide.....	23
Abbildung 6: Darstellung der vitalen, nekrotischen, früh- und spätapoptotischen Zellen.....	26
Abbildung 7: Heat Map der miRNA-Expression verschiedener hämatopoetischer Zellen.	32
Abbildung 8: Zunahme der Fluoreszenz während der PCR.....	35
Abbildung 9: Vergleich der Ct-Werte von zwei unabhängigen PCR-Versuchen.....	35
Abbildung 10: Expression der miR-142 in Zelllinien und gesunden Zellen.	36
Abbildung 11: Expression der miR-181a in Zelllinien und gesunden Zellen.	38
Abbildung 12: Expression der miR-142 in de novo Material.....	40
Abbildung 13: Expression der miR-181a in de novo Material.....	42
Abbildung 14: Überlebensdiagramm für die Expression der miR-181a.	43
Abbildung 15: Überlebensdiagramm für die miR-142.	44
Abbildung 16: Expression der miRs 142 und 181a in Zusammenhang mit diagnostischen Faktoren.....	45
Abbildung 17: Expression der miR-181a im Verlauf der Transfektion in der Zelllinie REH.....	47
Abbildung 18: Bestimmung der Transfektionseffizienz.....	48
Abbildung 19: Hemmung der miR-181a in der Zelllinie REH.	49
Abbildung 20: Hemmung der miR-181a in der Zelllinie MOLT-4.	50
Abbildung 21: Hemmung der miR-181a in der Zelllinie Jurkat.	51
Abbildung 22: Einfluss der miR-181a-Inhibition auf die Zellproliferation.	52
Abbildung 23: Einfluss der miR-181a Inhibition auf die metabolische Aktivität.	54
Abbildung 24: Apoptose- und Nekrose rate nach miR-181a Inhibition.	55
Abbildung 25: Expressionsprofil der untersuchten Oberflächenantigene in unbehandelten Leukämie-Zelllinien.	56
Abbildung 26: Expression der Oberflächenantigene nach miR-181a Inhibition.....	57
Abbildung 27: Expression von CD4 nach miR-181a Inhibition.	58
Abbildung 28: Expression des HMGB1 Proteins nach miR-181a Inhibition.....	59
Abbildung 29: Expression der HMGB1 mRNA nach miR-181a Inhibition.....	60
Abbildung 30: Phosphorylierung der Akt-Kinase nach miR-181a Inhibition.....	61
Abbildung 31: Expression des PTEN in REH Zellen nach miR-181a Inhibition.....	62
Abbildung 32: Bestimmung der Transfektionsrate in HL60-Zellen.	63
Abbildung 33: Expression der miR-181a nach Überexpression.....	64
Abbildung 34: Einfluss der miR-181a Überexpression auf die Zellproliferation.	65
Abbildung 35: Einfluss der miR-181a Überexpression auf die metabolische Aktivität.	66
Abbildung 36: Apoptose und Nekrose in HL60 Zellen nach miR-181a Überexpression.....	67
Abbildung 37: Expression von CD4 nach miR-181a Überexpression.....	68
Abbildung 38: Expression des HMGB1 in REH Zellen nach miR-181a Überexpression.	69
Abbildung 39: Phosphorylierung von Akt in REH Zellen nach miR-181a Überexpression.....	69
Abbildung 40: Expression von PTEN in REH Zellen nach miR-181a Überexpression.....	70

7. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: miRNA-mRNA-Bindestellen potenzieller Zielgene der miR-181a.....</i>	<i>7</i>
<i>Tabelle 2: Einteilung der AML nach FAB-Subtypen.</i>	<i>10</i>
<i>Tabelle 3: Zytogenetische Risikogruppen nach Grimwade et al. [44].....</i>	<i>10</i>
<i>Tabelle 4: Immunologische Subtypen der ALL nach Hoelzer et al. [46].....</i>	<i>11</i>
<i>Tabelle 5: Hochrisikomerkmale der ALL nach Hoelzer et al. [46].....</i>	<i>12</i>
<i>Tabelle 6: Verwendete Antikörper und Micro-Beads zur Isolierung hämatopoetischer Zellen.</i>	<i>16</i>
<i>Tabelle 7: Pipettierschema für den MasterMix der microRNA RT-PCR.....</i>	<i>19</i>
<i>Tabelle 8: Pipettierschema für den MasterMix (a) sowie Programm (b) der miRNA qPCR.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 9: Pipettierschema für die HMGB1-qPCR.....</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 10: Messprotokoll der Oberflächenantigene im Verlauf eines Inhibitionsversuches.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 11: Im Western Blot verwendete Antikörper und die entsprechenden Verdünnungen.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabelle 12: Zusammenfassung der HSZ-Anreicherungen.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 13: MiRNAs, welche für eine detaillierte Analyse ausgewählt wurden.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 14: Berechnung der PCR-Effizienz.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 15: Expressionsprofil der miR-142 mittels Microarrays.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 16: Expressionsprofil der miR-181a mittels Microarrays.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 17: miR-142 Expression und Überlebenszeit der Patienten mit intermediärem zytogenetischem Risiko.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 18: Mittlere Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 19: Relative mittlere Fluoreszenzintensität für CD4 nach miR-181a Inhibition.....</i>	<i>58</i>

8. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
ADAR	RNA-spezifische Adenosin Deaminase
AF	ALL1 fused to
Ago2	Argonaute 2
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APML	Akute Promyelozyten Leukämie
ASO	Antisense Oligonukleotid
BAALC	Brain and Acute Leukemia, Cytoplasmic
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytidin
cAMP	Cyclisches Adenosin-mono-Phosphat
CBF	Core-binding Factor
CD	Cluster of differentiation
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CEBPA	CCAAT/enhancer-binding protein alpha
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CR	complete remission
Ct-Wert	Thershold-Cycle
DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4 protein
DEPDC6	DEP domain-containing mTOR-interacting protein
DGCR8	Microprocessor complex subunit DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
ELL	eleven nineteen lysin rich leukemia (bezogen auf die Chromosomen, welche an der Translokation beteiligt sind)
ENL	eleven nineteen leukemia
FAB	French-American-British
FACS	Fluorecence activated cell sorting
FITC	Fluorescein
FKS	Fötales Kälberserum
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
FSC	Foward scatter; Vorwärtsstreulicht
GTP	Guanosintriphosphat
hgNHL	High grade non-hodgkin lymphoma / hoch maligne Non-Hodgkin lymphoma
HMGB1	High-mobility-group-box-1
hnRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
HOX-Gen	Homeobox-Gen
HPV	Humane Papillomviren

HSP	Hitzeshock protein
HSZ	Hämatopoetische Stammzellen
I	Inosin
ITD	Interne Tandemduplikation
LMO	LIM domain transcription factor
LNA	Locked-nucleic-acid
LOWESS	Locally Weighted Scatterplot Smoothing
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	Laser Scanning Microscope
MACS	magnetic activated cell sorting
MCs	Mononukleäre Zellen
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
miRNA/miR	microRNA
MLL1	Mixed-lineage-leukemia 1 (auch ALL1)
MRD	Minimal residual disease
mRNA	Messenger RNA
mTOR	Mammalian target of rapamycin
n.d.	Not done – nicht durchgeführt
NPM1	Nucleophosmin 1
NTC	No template control
Oligo	Oligonukleotid
P/S	Penicillin / Streptomycin
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin,
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PI3K	Phosphatidyl-inositol 3 Kinase
PIP2/3	Phosphatidylinositol-bisphosphat / -trisphosphat
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative PCR
REST	Relative Expression Software Tool
RISC	RNA-induced silencing complex
rMFI	Relative mittlere Fluoreszenzintensität
RNA	Ribonukleinsäure
RNA POL	RNA Polymerase
RT	Reverse Transkription
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEPT	Septin
siRNA	Small interfering RNA
SSC	Side scatter / Seitwärtsstreulicht
TCL1	T-cell leukemia/lymphoma protein 1
TCRα	T-Zell-Rezeptor alpha
TLR	Toll-like Rezeptor
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate

TRBP	RISC-loading complex subunit TARBP2
Treg	Regulatorische T-Zellen
UTR	Untranslatierte Region
WST	Water soluble tetrazolium

9. Anhang

9.1 Diskussion der miRs 451, 365,103,193a-3p und 98

Die miR-451 zeigt nur in HSZ eine starke Expression, in den anderen Proben liegt die Expression unter -2. Sie liegt gemeinsam mit der miR-144 in einem Cluster auf Chromosom 17 und ihre Transkription wird durch den Transkriptionsfaktor GATA-1 reguliert [240], ebenso scheinen die Proteine SMAD 3 und SMAD 4 eine Rolle zu spielen [241]. Allen drei Faktoren wird eine wichtige Rolle in der Hämatopoese zugeschrieben [242]. Die miR-144 wurde aus der finalen Analyse ausgeschlossen, da nicht alle technischen Replikate detektiert wurden; die vorhandenen Daten zeigen jedoch ein ähnliches Expressionsprofil wie die miR-451. Die miR-451 spielt eine wichtige Rolle in der Erythropoese, und ihre Expression nimmt während der Ausdifferenzierung gleichzeitig mit der Produktion von β -Globulin und Hämoglobin (als Erythrozyten-spezifische Marker) zu [206-207]. Als Zielgene konnten bisher das Produkt des MDR1-Genes (das P-Glycoprotein) und der Migration Inhibitory Factor (MIF) [243-244] identifiziert werden. Das P-Glycoprotein spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika, da es als ABC-Transporter am aktiven Transport verschiedener Substanzen (wie Doxorubicin, Etoposide, aber auch Immunsuppressiva) aus der Zelle beteiligt ist [245]. Kovaluchuk *et al.* konnten zeigen, dass in Brustkrebszellen das P-Glycoprotein in der 3' UTR der mRNA eine Bindestelle der miR-451 besitzt und eine Überexpression der miRNA zu einem reduzierten Proteinlevel führt. Darüber hinaus führt eine Doxorubicin-Behandlung in miR-451 überexprimierenden Zellen zu einer Verminderung der IC₅₀ um das 2,5 fache. Der MIF wird von reifen Leukozyten produziert, führt zu einer verminderten Makrophagen Migration und wirkt somit entzündungsfördernd [246]. Da die miR-451 nur in Stammzellen detektiert wurde (welche keinen MIF produzieren), nicht jedoch in den reiferen Zellen, unterstützt dies die Regulierung des MIF durch die miR-451 auch in Leukozyten. Die Analyse der Datenbanken ergab keine weiteren, in die Hämatopoese involvierten potenziellen Zielgene.

Die miR-365 zeigt in HSZ und B-Zellen mit -2,1 bzw. -1,4 eine sehr schwache Expression. In SEM liegt der Wert bei +1,1, bei RS4;11 bei 0 und bei MV4;11 bei +0,5. Sie besitzt zwei Genloci im humanem Genom: auf Chromosom 16, zusammen in einem Cluster mit der miR-193b und auf Chromosom 17. Die miR-193 zeigt ein ähnliches Expressionsprofil, allerdings ist der Wert von RS4;11 mit -2 deutlich niedriger. Zur Expression der miR-365 ist bisher wenig bekannt. Jedoch zeigt sie eine erhöhte Expression in Brustkrebszellen im Vergleich zu gesundem Gewebe [247] und steigt in Maus-Fibroblasten nach UVB-Bestrahlung an [248]. Maes *et al.* fanden eine deutlich niedrigere Expression in Zellen, welche einem Wachstumstopp unterliegen [249]. Regulatorische T-Zellen (CD3+, CD4+, CD27^{hi}+, CD127-) weisen gegenüber CD4+,CD25+ T-Zellen eine niedrigere Expression auf [250]. Einen ersten Hinweis auf eine Rolle in hämatologischen Erkrankungen fanden Unno *et al.* in einer miRNA-Expressionstudie in Patienten mit einem multiplen Myelom (MM, maligne Proliferation von Antikörper produzierenden B-Zellen). Die miR-365 weist in MM-Zellen eine signifikant höhere Expression auf als in gesunden Vergleichszellen [251]. Bisher wurden keine Daten zu funktionellen Untersuchungen veröffentlicht, als potenzielle Zielgene werden jedoch viele in Signalprozesse involvierte Proteine beschrieben (ARRB2, CSK, HHIP, PI3KR3, PLCB4, RasD1), aber auch das Hitzschockprotein A8 und das für die DNA-

Reparatur zuständige Protein REV3L zählen hierzu. Interessanterweise weist auch das durch MLL-Translokationen häufig angeschaltete Homeoboxgen MEIS1 eine miR-365-Bindestelle auf, so dass die höhere Expression dieser miRNA in SEM eine mögliche Feedback-Reaktion auf eine gesteigerte MEIS1-Expression darstellen könnte. Die Publikation von Unno *et al.* gibt darüber hinaus einen Hinweis, dass eine Dysregulation der miR-365 bei der Entstehung von hämatopoetischen Neoplasien eine Rolle spielen kann [251].

Die miR-103 zeigt eine schwache Expression in gesunden HSZ und B-Zellen (-0,7, -0,85), sowie eine moderate Expression in den Zelllinien (+0,5 - +1). Sie wird von zwei Genloci im humanem Genom abgelesen (Chr. 5 u. 20), beide befinden sich intronisch innerhalb eines Gens für unterschiedliche Panthothen-Kinasen. Ihr wird besonders eine Rolle in der Adipogenese, dem Lipid-Stoffwechsel und ein Zusammenhang mit Übergewicht zugeschrieben [252-254]. In Pankreaskrebs bildet sie gemeinsam mit den miRs 107 und 155 eine Signatur zur Unterscheidung von karzinomatösem und gesundem Gewebe [255]. Eine Überexpression in Speiseröhrenkrebs korreliert hingegen mit einer schlechten Überlebenswahrscheinlichkeit [256]. Zur Regulation der Expression wurden bisher nur wenige Daten veröffentlicht. So folgt einem Sauerstoffmangel eine erhöhte Expression, ebenso wie auf die Behandlung mit demethylierenden Reagenzien, was auf eine mögliche epigenetische Ursache einer Dysregulation hinweist [91, 173]. Als bisher einziges Zielgen wurde der Transkriptionsfaktor FOXJ2 identifiziert, welcher eine Rolle in der Erythropoese spielt. Die Expression der miR-103 sinkt im Verlauf dieses Differenzierungsprozesses [79]. Potenzielle weitere Zielgene der miR-103 sind verschiedene an Signalwegen beteiligte Moleküle (AXIN2, JUB, NF1, TGFBR3), Proteine, welche an der Gestaltung der Chromatinstruktur beteiligt sind (CHD1, TLK1) und die hämatopoetischen bzw. immunmodulatorischen Moleküle DLL1 (Notch-Rezeptor, blockiert die Differenzierung der B-Linie) und RNF125 (beteiligt an der T-Zell-Aktivierung).

Die miR-193a-3p zeigt in HSZ und B-Zellen nur eine sehr geringe Expression (-2, bzw. -1,7), eine geringe Expression in MV4;11 (-0,8) und eine moderate Expression in SEM und RS4;11 (+1,0 bzw. +0,4). Sie liegt intergenomisch auf Chromosom 17. Die reife miRNA des 3' Armes zeigt eine ~ 2,5 fach höhere Expression als der Gegenstrang [34]. Die miR-193a weist eine Homologie von 82 % zur miR-193b auf, die Seedsequenz ist jedoch identisch. Das Gen der miR-193b befindet sich gemeinsam mit der miR-365 in einem Cluster (s. oben). Die miR-193a weist eine verminderte Expression in oralen Plattenepithelkarzinom-Zellen auf, die von Kozaki *et al.* auf die Lage des Gens innerhalb einer CpG-Insel zurückführen. Die Behandlung der Zellen mit demethylierenden Reagenzien (5-aza-2-desoxycytidin) führt zu einer gesteigerten miR-193a Expression. Dies deutet auf eine epigenetische Stilllegung in diesen Zellen hin. Darüber hinaus korreliert in dieser Studie die Expression des potenziellen Zielgens E2F6 mit der miR-193a Expression [257]. Eine ektopische Überexpression führt zu einer verstärkten TRAIL-induzierten Apoptose [117]. Die Studie von Garzon *et al.* zur miRNA-Expression in AML-Patienten zeigt eine höhere miR-193a Expression in Zellen mit einer 11q23-Aberration im Vergleich zu allen anderen genetischen Veränderungen sowie eine niedrigere Expression in Patienten mit normalem Karyotyp im Vergleich zu aberranten Karyotypen [73]. Weitere Daten, in denen potenzielle Zielgene auf ihren Einfluss durch die miR-193a untersucht wurden, liegen zur Zeit nicht vor. Als mögliche Zielgene wurden verschiedene Transkriptionsfaktoren und -regulatoren beschrieben

(HOXD13, ZXH3) sowie der Wachstumsfaktor-Rezeptor GRB7 und die Ubiquitin-Protein-Ligase SIAH. Interessanterweise sind auch einige Proteine unter den potenziellen Ziel-mRNAs, welche in Verbindung mit Leukämien gebracht werden. So z.B. der Transkriptionsaktivator FLI1, der auf Chromosom 11q24.3 liegt und mit dem Transkriptionsrepressor ETV6 (in 3% der AML-Fälle in eine Translokation verwickelt) Homo- und Heterodimere bilden kann. Ebenso zählt der Core-binding-Faktor CBFA2T1 (RUNXT1) zu den potenziellen Zielgenen; Translokationen dieses Faktors führen zu einer AML M2. Das Zellzyklus-Protein Stathmin zeigt bei Patienten mit einer akuten Leukämie eine deutlich stärkere Expression als gesunde Zellen oder bei Patienten mit einer chronischen Leukämie. Das Adapterprotein AP2M1 spielt eine wichtige Rolle beim Transport von CTLA4, einem wichtigen Signalmolekül des T-Zell-Rezeptors.

Die miR-98 weist eine niedrige Expression in HSZ und B-Zellen auf (-0,5, -0,6) und leicht reduzierte Expression in SEM (-0,2), jedoch eine moderate Expression in RS4;11 und MV4;11. Sie gehört zur Familie der let-7 miRNAs und liegt gemeinsam mit der let-7f auf dem X-Chromosom intronisch des HUME1-Gens (kodiert für eine Ubiquitin-Protein-Ligase). Die miR-let-7f weist in allen Proben eine Expression zwischen -0,4 - +0,3 auf und zeigt somit keine signifikanten Unterschiede. Die miR-98 wird in Ratten durch Gabe von Freund's Adjuvans induziert [258] und scheint somit eine Rolle in der Inflammation zu spielen. Dies wird durch die Beobachtung von Jones *et al.* gestützt, die eine erhöhte Expression der miR-98 in Osteoarthritis-Patienten beschreiben. Eine Überexpression der miR-98 führt hier zu einer Reduktion der durch IL13 induzierten TNF α -Produktion [259]. Eine Zugabe von LPS zu Cholangiozyten führt jedoch zu einer verminderten miR-98-Expression [260]. Darüber hinaus wird sie durch Sauerstoffmangel und Estradiol induziert [261-262]. AML-Patienten mit einer NPM-Mutation zeigen eine erhöhte miR-98-Expression im Vergleich zu unmutierten Proben [98]. Als Zielgene sind bisher das HMGA2-Protein identifiziert, das transkriptional den Zellzyklus reguliert [261]. Darüber hinaus ist die HMGA2-Expression mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber Doxorubicin assoziiert. In der zitierten Arbeit konnten Hebert *et al.* zeigen, dass eine Überexpression der miR-98 zu einem verbesserten Überleben der Zellen bei Doxorubicin-Behandlung führt. In einem Rückkopplungsmechanismus kontrolliert die miR-98 die Estradiol-induzierten Gene c-MYC und E2F2 [262]. Legasse-Miller *et al.* beobachteten einen Einfluss der miR-98 auf die Expression des Proteins CIS, eines Suppressors des Zytokin-Signalweges [263]. Darüber hinaus schreiben Wang *et al.* ihr eine große Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus zu [264]. Zu den weiteren potenziellen Zielgenen der miR-98 (sowie der gesamte let-7-Familie) zählen verschiedene Signalmoleküle (APC2, DTX2, DUSP4, MAP4K3, PTPRU), epigenetische Faktoren (EZH1+2, FASLG, RNF5) sowie hämatopoetische bzw. immunmodulatorische Faktoren (MLLT10, CCL7, KLHL6, PBX3) und der Tumorsuppressor TUSC2.

9.2 Angaben zu den verwendeten Zelllinien

Name	Typ	Generiert aus	Zytogenetik	miR-181a		miR-142-3p	
				Expression	p-Wert*	Expression	p-Wert*
Jurkat	T-ALL	PBMC von 14 – jährigem Mädchen	human flat-moded hypotetraploid karyotype with 7.8% polyploidy - 87(78-91)<4n>XX, -Y, -Y, -5, -16, -17, -22, add(2)(p21)/del(2)(p23)x2 - sideline with additional der(5)t(5;10)(q11;p15), del(9)(p11)	1,00	0,99	3,27	0,00
MOLT-4	T-ALL	PBMC eines 19 – jährigen Mannes	human flat-moded hypertetraploid karyotype - 89-99<4n>XXYY, +4, +7, +8, +20, +20, del(6)(q16)x2, der(7)t(7;7)(p15;q11)x	3,66	0,00	4,73	0,00
REH	Vorläufer-B-ALL	PBMC von 15 – jährigem Mädchen	human pseudodiploid karyotype - 46(44-47)<2n>X, -X, +16, del(3)(p22),t(4;12;21;16)(q32;p13;q22;q24.3)-inv(12)(p13q22), t(5;12)(q31-q32;p12), der(16)t(16;21)(q24.3;q22) – sideline with inv(5)der(5)(p15q31),+18	2,37	0,00	4,46	0,00
SEM	Vorläufer-B-ALL	PBMC von 5 – jährigem Mädchen im Rückfall	human hypodiploid karyotype with 1.5% polyploidy - 45(40-46)<2n>XX, -13,t(4;11)(q21;q23), del(7)(p14)	1,74	0,02	1,85	0,10
RS4;11	Vorläufer-B-ALL	KM von 32 – jähriger Frau im Rückfall	Human hyperdiploid karyotype - 47/48<2n>X/XX, +8, +18, t(4;11)(q21;q23), i(7q) – sideline without +8/18	1,98	0,01	1,98	0,00
MV4;11	AML M5b	PBMC von 10 – jährigem Jungen	human hyperdiploid karyotype - 48(46-48)<2n>XY, +8, +18, +19, -21, t(4;11)(q21;q23)	0,85	0,58	3,07	0,00
HL60	AML M2	PBMC von 35 – jähriger Frau	human flat-moded hypotetraploid karyotype with hypodiploid sideline and 1.5% polyploidy - 82-88<4n>XX, -X, -X, -8, -8, -16, -17, -17, +18, +22, +2mar, ins(1;8)(p?31;q24hsr)x2, der(5)t(5;17)(q11;q11)x2, add(6)(q27)x2, der(9)del(9)(p13)t(9;14)(q?22;q?22)x2, der(14)t(9;14)(q?22;q?22)x2,der(16)t(16;17)(q22;q22)x1-2, add(18)(q21) - sideline with: -2, -5, -15, del(11)(q23.1q23.2) - c-myc amplicons present in der(1) and in both markers	0,47	0,00	3,53	0,00
NB4	AML M3	KM von 23 – jähriger Frau im 2. Rückfall	human hypertriploid karyotype with 3% polyploidy - 78(71-81)<3n>XX, -X, +2, +6, +7, +7, +11, +12, +13, +14, +17, -19, +20, +4mar, der(8)t(8;?) (q24;?), der(11)t(11;?) (?->:11p15->11q22.1::11q13->22.1.), der(12)t(12;?) (p11;?), 14p+, t(15;17)(q22;q11-12.1), der(19)t(10;19)(q21.1;p13.3)x2	1,61	0,04	3,24	0,00
DogKit	Burkitt - Lymphom	PBMC aus 57 – jährigem Mann im Rückfall	48,XY,dup(1)(q31q44),t(8;22)(q24;q11),der(19),t(14;18)(q23;q21),add(16)(pter),dup(17)(q12q24),+der(18)+20.	3,53	0,00	4,57	0,00
DogGum	Zentroblastisches NHL	Pleura-Flüssigkeit einer 49 – jährigen Frau	t(14;18)	0,74	0,28	0,99	0,95
GumBus	Burkitt - Lymphom	Liquor cerebrospinalis eines 28 – jährigen Mannes	t(8;14)(q24q31),add(3)(p11), del(6)(q14;q24)	0,34	0,00	2,82	0,00

Es ist die relative miRNA Expression vs. gesunden HSZ angegeben; * Signifikanzniveau bezogen auf HSZ.

9.3 Patientencharakteristika

Nr.	Diagnose	Karyotyp	FLT3	NPM1	MDS	Krankheitsstadium	Alter bei Diagnose [Jahre]	Therapieansatz	Überlebenszeit [Jahre]	miR-181a		miR-142-3p	
										Expression	p-Wert *	Expression	p-Wert*
01	AML M1	46,XY	pos.	pos.	nein	initial	68	kurativ	6 †	1,48	0,06	1,37	0,46
02	AML M2	47,XY,+8	pos.	pos.	nein	initial	53	kurativ	249 †	0,18	0,00	0,36	0,03
03	AML M2	46,XX	n.d.	n.d.	ja	initial	41	kurativ	210 †	0,61	0,03	1,24	0,62
04	AML M4	46,XX	pos.	neg.	nein	initial	27	kurativ	676	0,33	0,00	2,09	0,09
05	AML M1	46,XY	pos.	pos.	nein	initial	72	kurativ	272 †	3,40	0,00	0,85	0,67
06	AML M1	45,XY,-7	n.d.	n.d.	nein	initial	86	palliativ	154 †	4,39	0,00	4,83	0,00
07	AML M0	46,XY,del(12)(p11)	pos.	pos.	nein	initial	60	kurativ	182 †	1,19	0,46	3,01	0,02
08	AML M4	46,XX	n.d.	n.d.	nein	initial	74	palliativ	6 †	2,10	0,01	4,15	0,01
09	AML n.d	46,XY,dic(1;22)(q10;q10)	n.d.	n.d.	nein	rezidiv	54	palliativ	112 †	0,57	0,02	4,29	0,00
10	AML M2	46,XY	neg.	pos.	nein	initial	68	kurativ	464	1,56	0,01	1,71	0,11
11	AML M2	46, XX, del (5)(q13q33)	n.d.	n.d.	nein	rezidiv	70	kurativ	444	1,48	0,16	3,29	0,02
12	AML M2	46,XX	neg.	neg.	nein	initial	55	kurativ	248 †	0,80	0,28	10,42	0,00
13	AML M1	47,XY,+13	n.d.	n.d.	ja	initial	70	palliativ	79 †	1,22	0,33	2,50	0,03
14	AML n.d	46,XY	neg.	pos.	nein	initial	45	kurativ	635	3,97	0,00	2,35	0,03
15	AML M3	46, XX, t(15;17)(q22;q21) nuc ish (PMLx2),(RARAx2),(PML con RARAx1)	n.d.	n.d.	nein	initial	51	kurativ	33 †	13,56	0,00	2,11	0,07
16	AML M2	45,XY,-7	n.d.	n.d.	ja	initial	65	palliativ	44 †	0,85	0,44	5,27	0,00
17	AML M2	47,XY,+8	pos.	neg.	ja	initial	70	kurativ	181 †	0,97	0,88	1,65	0,26
18	AML M0	46,XY	neg.	neg.	nein	initial	64	kurativ	268	0,18	0,00	2,30	0,04
19	AML M7	45-47,X,-X,t(1;?)p(?),-2,t(3;?) (p24;?),add(4)(qter),-5,del(6)(q21q26), add(6)(qter),del(7)(q?21q22,q?32q35),-8,der(12)t(8;12)(q13;p?13),	neg.	neg.	nein	rezidiv	56	kurativ	800	3,28	0,00	0,65	0,31
20	AML M5	46,XX	n.d.	n.d.	nein	initial	84	palliativ	2 †	1,58	0,04	1,41	0,44

*n.d.: nicht bestimmt; †: verstorben. Es ist die relative miRNA Expression vs. gesunden HSZ angegeben; * Signifikanzniveau bezogen auf HSZ..*

Nr.	Diagnose	Karyotyp	FLT3	NPM1	MDS	Krankheitsstadium	Alter bei Diagnose [Jahre]	Therapieansatz	Überlebenszeit [Jahre]	miR-181a		miR-142-3p	
										Expression	p-Wert *	Expression	p-Wert*
21	AML n.d	46,XX	neg.	neg.	ja	initial	71	kurativ	161 †	2,04	0,00	1,06	0,88
22	AML n.d	46,XX	neg.	pos.	nein	initial	73	palliativ	7 †	3,59	0,00	1,84	0,16
23	AML M1	45,XX,del(2)(p1?5),-3,del(5)(q13q33),der(7)t(7;8)(p11;q10),i(8)(q10), t(12;?)(p11;?)[2]/45,XX,idem,-7,+i(8)(q10)	neg.	neg.	ja	initial	75	palliativ	150 †	1,04	0,86	1,76	0,21
24	AML M1	47,XX,+21	neg.	pos.	nein	initial	66	kurativ	196	1,69	0,02	0,86	0,73
25	AML M5	46,XX,t(4;11)(q21;q23)	neg.	neg.	nein	initial	67	palliativ	2 †	1,19	0,39	2,45	0,04
26	AML M1	46,XY	n.d.	n.d.	nein	initial	69	palliativ	19 †	1,06	0,77	6,49	0,00
27	AML M4	46,XY	pos.	neg.	nein	initial	72	palliativ	76 †	0,96	0,81	1,69	0,22
28	AML n.d	46,XX	neg.	neg.	nein	initial	79	palliativ	76 †	2,92	0,00	1,52	0,34
29	AML M4	46,XY	neg.	pos.	nein	initial	53	kurativ	81	0,49	0,00	3,69	0,01
30	c-ALL	nuc ish 9q34(ABLx3),22q11(BCRx3)(ABL con BCRx2)	n.d.	n.d.	-	rezidiv	77	kurativ	287 †	0,40	0,00	1,42	0,27
31	T-ALL	46,XY	n.d.	n.d.	-	initial	26	kurativ	517	1,03	0,89	4,59	0,00
32	Sézary	n.d.	n.d.	n.d.	-	rezidiv	62	kurativ	719	0,37	0,00	9,62	0,00
33	c-ALL	Nucish(mycx2), (p16,CEP9)x2(ABL,BCR)x2, (MLLx2), (IGHx2)(IGH3' sep IGHVx1)	n.d.	n.d.	-	intial	38	kurativ	348	3,32	0,00	3,60	0,00
34	c-ALL	47,XX,+8,t(9;22)(q34;q11),der(9)t(9;22)(q34;q11). ish (ABL1x3),(BCRx4), (ABL1 con BCRx3)	n.d.	n.d.	-	initial	41	kurativ	58	4,76	0,00	1,76	0,12
35	Sézary	n.d.	n.d.	n.d.	-	rezidiv	75	palliativ	375	1,92	0,01	11,17	0,00
36	pro-B-ALL	46,XX,t(4;11)(q21;q23)	n.d.	n.d.	-	inital	71	kurativ	148	5,42	0,00	2,86	0,02
37	c-ALL	47,XY,del(6)(q?16q23),+19,add(20)(p)	n.d.	n.d.	-	initial	21	kurativ	50	2,56	0,00	0,45	0,19

*n.d.: nicht bestimmt; †: verstorben. Es ist die relative miRNA Expression vs. gesunden HSZ angegeben; * Signifikanzniveau bezogen auf HSZ.*

9.4 MiR-181a Expression nach Hemmung mittels ASO

REH (Abb. 21)		15h		24h		48h		72h				15h		24h		48h		72h										
		RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181					
K	#1	22,5	22,3	21,7	21,8	22,2	23,2	22,1	22,1	LNA-AS	22,5	22,4	22,0	22,0	22,0	22,2	21,7	22,0	LNA-181	24,0	27,0	22,6	25,8	23,3	28,3	22,1	27,6	
		22,4	22,2	21,9	21,7	22,0	22,0	22,2	22,3		22,1	22,2	22,1	22,0	21,9	22,0	21,6	21,9		23,8	26,7	22,7	25,8	23,4	28,2	22,3	27,6	
		22,2	22,3	22,1	21,9	21,9	21,9	22,3	22,2		22,1	22,3	22,1	22,1	21,9	22,0	21,9	22,3		23,5	26,6	22,5	28,3	23,2	28,2	22,3	28,1	
	#2	22,0	22,0	21,9	22,2	21,9	23,4	21,8	22,4		22,5	22,8	22,1	21,4	22,3	22,7	21,9	22,1		23,3	27,4	22,7	26,4	22,3	27,9	21,9	27,4	
		21,7	22,2	22,0	22,2	21,7	22,2	21,8	22,6		22,4	22,5	22,2	21,2	22,2	22,5	21,8	22,0		22,9	27,3	23,0	26,3	22,6	28,2	22,1	27,5	
		21,8	22,1	22,3	22,5	21,8	22,1	21,8	23,0		22,5	22,5	22,2	21,4	22,1	22,4	22,1	22,3		22,6	27,1	22,9	26,4	22,3	27,8	22,1	27,6	
	#3	22,4	22,3	22,4	23,0	22,1	22,7	21,5	22,2		22,1	22,4	22,0	22,4	21,7	22,2	21,4	22,1		22,2	26,9	23,3	28,7	22,1	27,4	22,0	27,6	
		22,2	22,4	22,6	23,1	21,8	22,4	21,7	22,3		22,1	22,6	21,9	22,4	21,7	22,1	21,4	22,2		22,4	27,2	23,4	28,6	22,4	27,5	22,1	28,0	
		22,2	22,5	22,7	23,1	22,0	22,5	21,6	22,0		22,1	22,5	22,1	22,4	21,5	22,1	21,7	22,4		22,4	27,1	23,5		22,1	27,2	22,2	28,1	
Rel. Expression		1		1		1		1		0,924		1,348		1,206		0,972		0,053		0,057		0,032		0,021				
p-Wert										0,310		0,048		0,212		0,798		0,001		0,001		0,001		0,001				
AS	#1	22,1	22,1	21,9	22,1	23,2	23,1	22,3	22,2	181	22,3	25,5	22,1	24,7	22,0	23,8	22,0	23,1	Angegeben sind die Ct-Werte der einzelnen PCRs sowie die relative Expression bezogen auf die Expression in der Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt, berechnet nach der REST-Methode.									
		21,9	22,0	22,0	21,9	22,9	22,9	22,2	22,4		22,2	25,3	22,4	24,4	22,0	23,8	22,0	23,1										
		21,9	21,9	22,1	22,0	22,7	23,0	22,4	25,5		22,1	25,3	22,1	24,5	21,6	23,6	21,6	23,6										
	#2	22,1	22,4	22,9	23,3	21,9	22,1	22,1	22,1		22,4	28,8	22,0	28,1	22,0	26,7	22,4	26,9										
		22,1	22,2	22,9	23,1	21,6	22,1	21,8	21,8		22,1	28,8	22,1	27,8	22,1	26,7	22,6	27,0										
		21,9	22,3	23,0	23,1	21,6	22,0	22,1	22,1		22,1	28,6	22,0	27,9	21,8	26,5	22,8	27,5										
	#3	22,2	22,1	22,2	22,3	22,1	22,6	21,7	22,0		22,7	31,2	22,3	30,2	22,0	28,4	21,4	26,0										
		22,2	22,1	22,1	22,4	22,0	22,4	21,4	22,2		22,6	31,0	22,2	30,2	22,2	28,5	21,6	26,1										
		22,0	22,1	22,2	22,5	21,8	22,2	21,7	22,3		22,3		22,0	30,1	21,9	28,2	21,5	26,4										
Rel. Expression		1,013		1,07		1,22		1,16		0,015		0,023		0,065		0,10												
p-Wert		0,848		0,56		0,2		0,2		0,001		0,001		0,001		0,001												

9.4 MiR-181a Expression nach Hemmung mittels ASO

MOLT-4 (Abb. 22)		15h		24h		48h		72h			15h		24h		48h		72h			15h		24h		48h		72h	
		RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181		RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181		RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181
K	#1	22,5	22,0	22,6	22,4	22,4	22,9	22,3	21,9	LNA-AS	22,9	22,3	21,8	22,3	23,1	22,7	21,9	21,4	LNA-181	22,9	25,9	22,3	28,1	22,5	28,8	21,7	26,0
		22,1	22,1	22,9	22,2	22,3	22,0	22,2	22,1		22,9	22,1	21,8	22,4	23,1	22,7	21,6	21,2		22,6	25,7	22,5	28,0	22,6	28,6	21,9	26,0
		22,3	21,9	22,9	22,4	22,3	22,0	22,3	22,1		22,4	22,1	22,0	22,5	22,9	22,4	22,0	21,7		22,6	25,5	22,5	27,9	22,4	28,4	22,2	26,2
	#2	21,4	21,1	22,1	22,1	22,1	22,7	22,0	22,2		22,1	22,1	22,0	21,7	22,0	22,0	22,6	21,5		22,8	26,4	22,0	28,2	20,9	29,3	21,6	26,6
		21,4	21,1	22,1	22,1	22,0	21,7	21,9	21,9		22,0	22,0	21,9	21,9	22,1	22,0	22,4	21,6		23,1	26,4	22,0	28,3	21,1	29,2	21,7	26,5
		21,2	21,1	22,4	22,1	21,8	21,9	22,1	22,0		22,0	21,9	21,9	21,8	22,0	21,8	22,7	21,5		22,9	26,3	22,0	28,2	20,8	29,0	21,7	26,6
	#3	22,2	21,6	21,8	21,5	22,2	22,7	22,1	21,5		22,4	22,4	22,2	22,2	22,1	22,2	22,3	22,0		22,5	27,5	22,2	25,1	22,8	25,4	22,0	25,4
		22,4	21,6	22,1	21,6	21,9	21,6	22,1	22,0		22,2	22,2	22,3	22,0	22,0	22,1	22,2	22,2		22,3	27,4	22,5	24,9	23,3	25,2	22,0	25,3
		22,1	21,8	22,2	21,6	22,0	21,7	22,3	22,2		22,2	22,2	22,3	22,4	22,0	21,8	22,3	22,4		22,4	27,3	22,3	25,0	22,8	25,0	22,1	25,4
Rel. Expression		1		1		1		1		0,843		0,695		0,666		1,184		0,026		0,017		0,019		0,041			
p-Wert										0,048		0,001		0,441		0,087		0,001		0,001		0,001		0,001			
AS	#1	22,9	22,0	21,9	21,5	22,1	21,6	22,9	22,3	181	22,5	27,2	22,1	27,5	22,5	25,4	22,3	24,3	Angegeben sind die Ct-Werte der einzelnen PCRs sowie die relative Expression bezogen auf die Expression in der Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt, berechnet nach der REST-Methode.	22,3	26,9	22,1	27,3	22,6	25,5	22,2	24,3
		22,4	21,3	21,9	21,5	22,1	21,6	23,3	22,4		22,2	27,1	22,2	27,3	22,4	25,2	22,4	24,4		22,2	27,1	22,2	27,3	22,4	25,2	22,4	24,4
		22,5	21,7	22,0	21,7	22,5	21,7	21,9	21,7		21,9	30,7	21,8	27,3	22,1	26,6	21,0	26,6		21,9	30,7	21,8	27,3	22,1	26,6	21,0	26,6
	#2	22,5	21,7	22,0	21,8	22,4	21,7	21,8	21,8		21,9	30,6	22,1	27,0	22,2	26,7	21,2	26,9		21,9	30,6	22,1	27,0	22,2	26,7	21,2	26,9
		22,4	21,7	22,1	21,7	22,4	21,6	22,1	21,8		22,0	30,7	22,0	27,2	22,0	26,7	21,4	26,7		22,4	30,7	22,0	27,2	22,0	26,7	21,4	26,7
		22,3	21,7	21,4	21,6	21,9	22,0	21,8	22,1		22,1	28,9	22,0	26,7	22,1	25,3	21,7	24,3		22,3	28,9	22,0	26,7	22,1	25,3	21,7	24,3
	#3	22,0	21,6	21,6	21,5	21,8	22,0	21,8	22,3		22,2	28,8	22,4	26,2	22,3	25,2	21,9	24,2		22,2	28,8	22,4	26,2	22,3	25,2	21,9	24,2
		21,9	21,7	21,8	21,7	21,7	21,9	22,0	22,5		22,2	29,2	22,1	26,3	22,0	25,1	22,0	24,3		22,2	29,2	22,1	26,3	22,0	25,1	22,0	24,3
	Rel. Expression		1,181		0,877		0,778		0,899		0,005		0,020		0,044		0,071										
p-Wert		0,058		0,080		0,572		0,319		0,001		0,001		0,001		0,001											

9.4 MiR-181a Expression nach Hemmung mittels ASO

Jurkat (Abb. 23)		15h		24h		48h		72h			15h		24h		48h		72h			15h		24h		48h		72h	
		RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181		RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181		RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181
K	#1	22,0	23,0	22,3	23,7	22,3	24,8	21,7	23,1	LNA- AS	22,8	23,8	22,5	23,7	22,5	24,2	22,5	24,0	LNA- 181	23,3	27,6	22,4	27,2	22,9	28,3	22,2	26,2
		22,0	23,0	22,4	23,6	22,1	23,6	21,8	23,0		22,8	23,7	22,4	23,6	22,4	24,0	22,3	24,0		23,1	27,3	22,6	26,7	23,0	28,2	22,5	26,3
		21,9	23,0	22,5	23,9	22,1	23,5	21,9	23,3		22,6	23,9	22,5	23,6	22,3	24,2	22,5	24,5		23,2	27,4	22,5	27,0	22,7	28,3	22,5	26,2
	#2	22,3	23,6	22,0	24,7	22,6	25,4	22,2	24,4		22,1	23,5	22,0	23,8	22,1	24,5	22,6	24,5		22,3	30,0	22,3	29,6	21,2	27,2	21,2	27,6
		22,1	23,7	22,2	23,7	22,3	24,2	21,8	24,5		21,9	23,4	22,1	23,7	22,4	24,2	22,4	24,5		22,2	29,5	22,5	29,5	21,4	27,0	22,0	27,7
		22,2	23,6	22,1	23,8	22,3	24,2	22,2	24,2		21,9	23,5	22,3	23,7	22,3	24,3	22,9	24,4		22,2	29,5	22,3	29,4	21,1	27,1	22,2	27,4
	#3	22,1	23,1	22,0	23,4	22,1	24,6	21,6	22,9		22,4	23,9	21,9	23,2	22,2	24,0	21,9	23,6		22,5	27,1	22,4	27,5	22,1	25,8	21,3	26,8
		22,0	23,1	21,7	23,2	22,1	23,3	21,5	23,1		22,2	23,7	21,8	23,2	22,2	23,7	21,7	23,6		22,3	27,0	23,0	27,2	22,4	25,7	21,1	26,8
		22,0	23,1	22,1	23,6	21,8	23,2	21,4	23,2		22,3	23,6	22,1	23,3	22,0	23,7	22,1	24,0		22,4	27,1	22,5	27,3	22,1	25,8	21,5	26,7
Rel. Expression		1		1		1		1		0,824		1,084		1,132		0,875		0,040		0,055		0,102		0,083			
p-Wert										0,044		0,438		0,463		0,246		0,001		0,001		0,001		0,001			
AS	#1	22,7	24,2	22,4	23,6	22,4		22,2	23,1	181	22,9	23,3	23,0	24,2	22,3	22,9	21,5	22,7		Angegeben sind die Ct-Werte der einzelnen PCRs sowie die relative Expression bezogen auf die Expression in der Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt, berechnet nach der REST-Methode.							
		22,6	24,2	22,5	23,6	22,5		22,3	23,2		22,6	23,2	23,1	23,8	22,7	22,9	21,5	22,7									
		22,5	23,7	22,5	23,8	22,3		22,4	23,5		22,5	23,2	22,9	23,8	22,2	22,7	21,7	22,8									
	#2	22,3	24,1	22,1	24,1	23,6	24,3	21,5	23,4		22,7	29,7	22,3	29,4	22,5	26,9	22,4	26,2									
		22,2	23,8	22,2	24,0	23,7	24,3	21,4	23,5		22,4	29,8	22,6	29,1	22,7	27,0	22,3	26,2									
		22,2	23,7	22,3	24,2	23,7	24,2	21,9	23,6		22,6	30,0	22,4	29,2	22,4	26,8	22,3	25,9									
	#3	22,5	24,0	22,2	23,8	21,3	23,2	21,0	22,5		22,2	28,2	21,9	26,7	21,7	26,4	21,1	24,8									
		22,4	23,7	22,1	23,6	21,2	22,9	21,1	22,7		22,1	28,2	22,1	26,4	22,1	26,4	21,2	25,0									
		22,3	23,6	22,3	23,6	21,1	22,7	21,6	22,9		22,2	28,2	22,2	26,4	21,6	26,2	21,4	25,6									
Rel. Expression		1,195		0,962		1,639		1,147		0,073		0,149		0,397		0,383											
p-Wert		0,5		0,723		0,020		0,303		0,001		0,001		0,017		0,001											

9.5 MiR-181a Expression nach Überexpression mittels Mimic

MOLT-4 (Abb. 35)		15h		24h		48h		72h			15h		24h		48h		72h			15h		24h		48h		72h			
		RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181		RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181		RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181
K	#1	22,5	22,3	22,0	21,9	22,2	23,7	21,7	22,1	AS	22,4	22,6	22,2	22,2	22,2	21,7	22,4	21,6	181	22,4	16,0	22,5	16,9	22,5	17,0	22,2	17,3		
		22,3	22,3	21,8	22,1	22,2	22,1	21,9	22,0		22,1	21,8	22,2	21,9	22,2	21,7	22,5	21,6		22,2	16,0	22,6	16,5	22,7	17,0	22,2	17,3		
		22,3	22,2	22,0	22,2	22,2	22,1	21,9	22,0		22,1	21,8	22,4	21,9	22,1	21,7	22,8	21,6		22,2	16,1	22,6	16,6	22,4	16,9	22,3	17,2		
	#2	22,4	22,0	21,8	21,1	22,5	22,0	22,0	21,7		21,9	21,2	22,0	21,5	23,2	22,4	22,3	21,7		21,8	15,0	22,8	16,4	23,2	16,5	22,9	16,5		
		22,3	22,1	21,9	21,1	22,4	22,0	22,0	21,7		21,5	20,7	22,1	21,3	22,9	22,5	22,3	21,6		21,6	15,0	23,0	16,0	23,4	16,5	22,8	16,6		
		22,3	21,9	21,9	21,5	22,4	23,3	22,2	21,7		21,5	20,7	22,2	21,3	23,0	22,3	22,8	22,0		21,5	14,9	22,9	16,1	23,2	16,5	23,2	16,6		
	#3	21,6	22,1	21,7	22,4	20,7	21,3	21,7	22,1		22,4	22,5	22,2	22,6	21,2	21,0	21,9	21,6		22,7	16,2	21,8	16,1	21,6	15,8	21,6	15,7		
		21,5	21,9	21,7	22,3	20,6	21,2	21,7	22,2		22,4	22,4	22,2	22,1	21,0	20,8	21,8	21,4		22,6	16,1	22,0	15,8	21,9	15,8	21,7	15,7		
		21,6	21,8	21,8	22,6	20,6	22,5	22,0	22,4		22,3	22,2	22,3	22,3	21,0	20,8	22,2	21,4		22,9	16,5	22,1	15,8	21,6	15,8	21,9	15,8		
	Rel. Expression	1		1		1		1				1,210		1,287		1,723		1,845			114,5		102,6		106,1		74,3		
	p-Wert											0,462		0,165		0,002		0,001			0,001		0,001		0,001		0,001		

Angegeben sind die Ct-Werte der einzelnen PCRs sowie die relative Expression bezogen auf die Expression in der Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt, berechnet nach der REST-Methode.

9.5 MiR-181a Expression nach Überexpression mittels Mimic

REH (Abb. 35)		15h		24h		48h		72h			15h		24h		48h		72h			15h		24h		48h		72h				
		RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181		RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181		RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181	
K	#1	21,4	22,5	21,2	22,3	21,3	23,3	21,4	22,4	AS	21,9	21,1	21,4	22,3	22,0	22,6	21,6	22,3	181	22,0	15,1	21,3	15,3	21,7	15,0	21,5	14,8			
		21,1	22,1	21,3	22,3	21,3	22,1	21,3	22,5		21,7	21,1	21,3	21,9	21,3	22,4	21,6	22,1		21,8	15,0	21,4	15,0	21,7	15,0	21,7	14,8			
		20,8	22,2	21,3	22,5	21,5	22,0	21,3	22,4		21,4	20,9	21,4	21,9	21,5	22,2	21,7	22,1		21,5	14,9	21,3	15,0	21,7	14,8	21,9	14,8			
	#2	21,7	23,7	21,3	23,7	21,2	24,9	21,0	23,4		21,5	23,6	21,9	23,8	21,7	23,3	21,3	23,2		21,5	15,4	21,7	15,5	21,7	15,1	22,2	15,3			
		21,3	23,6	21,2	24,1	21,2	23,7	21,0	23,4		21,3	23,1	21,7	23,8	21,6	23,2	21,3	23,1		21,5	15,6	22,0	15,2	21,8	15,0	22,3	15,3			
		21,3	23,3	21,4	24,1	21,2	23,5	21,2	23,8		21,3	23,2	22,0	23,6	21,5	23,2	21,4	23,5		21,8	15,3	21,9	15,3	21,6	15,0	22,6	15,4			
	#3	22,2	23,8	21,6	22,9	21,0	22,5	21,1	22,4		22,0	20,9	22,0	22,7	22,0	22,3	21,6	22,4		21,7	12,7	21,8	13,2	22,1	13,0	21,5	13,2			
		22,1	23,0	21,8	23,0	20,9	22,5	21,1	22,6		21,7	20,7	21,8	22,5	21,8	22,6	21,6	22,4		21,8	12,5	21,9	12,7	22,1	12,8	21,9	13,1			
		22,2	23,1	21,7	23,4	21,1	22,5	21,4	22,9		21,6	20,5	21,9	22,4	21,9	22,6	21,9	22,3		21,7	12,7	22,0	13,0	22,0	12,8	21,8	13,0			
	Rel. Expression		1		1		1		1			2,480		1,532		1,915		1,573			655,0		730,8		1035,3		849,2			
	p-Wert											0,013		0,09		0,027		0,071			0,001		0,001		0,001		0,001			

Angegeben sind die Ct-Werte der einzelnen PCRs sowie die relative Expression bezogen auf die Expression in der Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt, berechnet nach der REST-Methode.

9.5 MiR-181a Expression nach Überexpression mittels Mimic

HL60 (Abb. 35)		15h		24h		48h		72h			15h		24h		48h		72h			15h		24h		48h		72h	
		RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181		RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181		RNU	181	RNU	181	RNU	181	RNU	181
K	#1	21,5	25,1	22,0	24,6	21,2	26,6	21,1	25,1	AS	21,7	24,8	21,9	25,6	22,1	25,5	21,8	24,3		21,7	13,9	22,0	14,1	21,7	13,9	21,5	13,7
		21,5	25,0	21,8	24,6	21,1	25,4	21,1	25,0		21,4	24,1	22,2	25,1	22,0	25,3	21,4	24,7		21,8	13,7	22,0	13,8	21,8	14,0	21,6	13,7
		21,4	24,9	21,8	25,1	21,2	25,4	21,3	25,4		21,3	24,0	22,1	25,4	21,7	25,5	21,7	24,6		21,6	13,7	22,0	13,8	21,7	13,8	22,0	13,7
	#2	22,8	24,6	21,4	25,9	21,9	26,3	21,4	25,9		21,8	23,9	21,3	25,3	21,8	25,2	21,6	24,8		22,8	14,3	21,3	12,8	21,7	13,2	21,9	13,4
		22,6	25,4	21,4	25,5	21,9	26,1	21,6	26,1		21,7	24,0	21,3	25,1	21,8	25,4	21,5	25,0		22,7	14,0	21,6	13,0	21,8	13,3	22,0	13,5
		22,4	25,5	21,3	25,8	22,2	27,4	21,9	25,6		21,5	24,5	21,8	25,0	21,4	25,2	22,0	24,7		22,7	14,1	21,6	13,3	22,0	13,2	22,2	13,5
	#3	21,2	25,1	21,1	23,7	21,5	26,8	21,1	24,6		21,4	23,1	21,5	24,6	21,6	24,9	21,6	25,1		22,3	14,3	21,3	13,3	21,8	13,3	22,4	13,8
		21,1	24,3	21,0	23,6	21,5	24,9	21,0	24,7		21,4	22,7	21,5	24,5	21,5	24,5	21,5	25,2		22,4	14,2	21,4	13,3	22,1	13,2	22,4	14,0
		21,2	24,3	21,0	24,2	21,5	25,2	21,6	24,4		21,3	22,5	21,7	24,6	21,4	24,6	21,7	25,2		22,2	14,2	21,4	13,8	22,0	13,3	22,8	13,9
Rel. Expression		1		1		1		1			2,045		2,749		2,181		1,580			4738,6		4749,7		12973,1		8040,0	
p-Wert											0,005		0,009		0,001		0,011			0,001		0,001		0,001		0,001	

Angegeben sind die Ct-Werte der einzelnen PCRs sowie die relative Expression bezogen auf die Expression in der Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt, berechnet nach der REST-Methode.

9.6 Zellproliferation nach miR-181a Inhibition

REH (Abb. 24)		Zellzahl [x 10 ⁶]													
		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h
K	# 1	2,23	2,43	4,74	7,83	LNA - AS	1,16	1,16	2,54	3,78	LNA - 181a	1,14	1,11	1,8	2,98
	# 2	1,5	2,57	3,64	5,13		2,14	2,72	2,84	5,55		0,95	0,81	1,22	1,05
	# 3	1,09	1,24	1,07	2,05		0,96	0,96	1,14	1,68		0,75	0,73	0,68	0,84
MW		1,66	1,83	2,9	4,94		1,42	1,61	2,17	3,67		0,95	0,88	1,23	1,62
SD		0,58	0,73	1,88	2,89		0,63	0,96	0,91	1,94		0,19	0,2	0,56	1,18
t-Test vs. K							0,73	0,54	0,48	0,55		0,18	0,1	0,21	0,17
t-Test vs. AS												0,32	0,32	0,22	0,21

AS	# 1	2,06	1,95	4,92	6,1	181a	2,35	1,88	3,54	7,9
	# 2	1,59	2,07	2,98	4,5		1,89	1,76	2,62	3,85
	# 3	1,33	1,06	1,09	1,72		1,58	1,69	1,75	2,14
MW		1,66	1,69	3	4,11		1,94	1,77	2,64	4,63
SD		0,37	0,55	1,92	2,22		0,39	0,09	0,9	2,96
t-Test vs. K		0,9	0,51	0,93	0,69		0,98	0,31	0,35	0,28
t-Test vs. AS							0,83	0,65	0,41	0,36

Angegeben sind die Einzelwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzwerte. Bei der Berechnung der p-Werte gegenüber der unspezifischen Kontrolle (AS) wurden die Proben verglichen, die mit der gleichen Art ASO transfiziert wurden.

9.6 Zellproliferation nach miR-181a Inhibition

MOLT-4 (Abb. 24)		Zellzahl [x 10 ⁶]													
		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h
K	# 1	1,73	3,11	3,22	5,28	LNA - AS	0,69	1,67	1,66	2,58	LNA - 181a	0,71	1,22	2,04	3,95
	# 2	1,71	1,65	2,75	3,24		0,84	0,71	0,89	1,28		0,75	0,91	1,1	1,46
	# 3	1,26	2,12	2,95	4,13		0,83	1,54	1,4	2,7		0,66	1,07	1,18	1,95
MW		1,49	2,61	3,09	4,7		0,78	1,31	1,32	2,19		0,71	1,07	1,44	2,45
SD		0,26	0,74	0,24	1,02		0,08	0,52	0,39	0,78		0,04	0,15	0,52	1,32
t-Test vs. K							0,03	0,14	0,01	0,06		0,03	0,1	0,02	0,15
t-Test vs. AS												0,26	0,51	0,76	0,78

AS	# 1	1,6	2,4	2,88	4,5	181a	1,55	2,19	2,56	5,1
	# 2	1,33	1,25	1,75	2,9		1,5	1,85	2,64	3,35
	# 3	1,66	2,22	2,28	4,39		1,5	2,17	3,4	3,71
MW		1,53	1,96	2,3	3,93		1,52	2,07	2,87	4,05
SD		0,18	0,62	0,57	0,89		0,03	0,19	0,46	0,92
t-Test vs. K		0,85	0,58	0,17	0,74		0,77	0,66	0,75	0,85
t-Test vs. AS							0,92	0,79	0,25	0,88

Angegeben sind die Einzelwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzwerte. Bei der Berechnung der p-Werte gegenüber der unspezifischen Kontrolle (AS) wurden die Proben verglichen, welche mit der gleichen Art ASO transfiziert wurden.

9.6 Zellproliferation nach miR-181a Inhibition

Jurkat (Abb. 24)		Zellzahl [x 10 ⁶]													
		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h
K	# 1	2,54	3,8	6,95	16,05	LNA - AS	1,11	1,7	2,95	6,15	LNA - 181a	1,15	1,21	2,33	8,3
	# 2	1,26	2,12	2,95	4,13		0,83	1,54	1,4	2,7		0,66	1,07	1,18	1,95
	# 3	1,73	1,66	2,88	8,78		1,08	1,14	2,65	6,3		0,63	1,03	1,45	2,7
MW		2,13	2,73	4,91	12,41		1	1,46	2,33	5,05		0,81	1,1	1,65	4,32
SD		0,65	1,12	2,33	6,01		0,16	0,29	0,82	2,04		0,29	0,09	0,6	3,47
t-Test vs. K							0,15	0,24	0,29	0,32		0,09	0,16	0,19	0,27
t-Test vs. AS												0,39	0,16	0,32	0,77

AS	# 1	2,3	4,52	8,35	15,9	181a	3,11	3,13	6,99	14,3
	# 2	1,66	2,22	2,28	4,39		1,5	2,17	3,4	3,71
	# 3	1,39	1,82	2,78	5,66		1,49	1,79	3,18	6,45
MW		1,78	2,85	4,47	8,65		2,03	2,36	4,52	8,15
SD		0,47	1,45	3,37	6,31		0,93	0,69	2,14	5,5
t-Test vs. K		0,91	0,77	0,93	0,85		0,79	0,84	0,89	0,77
t-Test vs. AS							0,71	0,64	0,98	0,92

Angegeben sind die Einzelwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzwerte. Bei der Berechnung der p-Werte gegenüber der unspezifischen Kontrolle (AS) wurden die Proben verglichen, welche mit der gleichen Art ASO transfiziert wurden.

9.7 Zellproliferation nach miR-181a Überexpression

REH (Abb. 36)		Zellzahl [x 10 ⁶]													
		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h
K	# 1	1,21	1,43	1,41	1,54	AS	1,36	1,44	1,47	1,51	181a	1,29	1,33	1,43	1,14
	# 2	0,87	1,17	0,95	1,56		1,1	1,22	1,15	1,55		0,84	1,31	0,98	1,68
	# 3	0,99	0,98	1,79	1,71		1,16	1,58	1,2	2,03		1,16	1,19	1,25	1,89
MW		1,1	1,2	1,6	1,63		1,2	1,41	1,27	1,69		1,1	1,27	1,22	1,57
SD		0,17	0,22	0,42	0,09		0,13	0,18	0,17	0,29		0,24	0,07	0,22	0,39
t-Test vs. K							0,23	0,26	0,71	0,66		0,66	0,6	0,59	0,88
t-Test vs. AS												0,54	0,31	0,75	0,67

Angegeben sind die Einzelwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzwerte.

MOLT-4 (Abb. 36)		Zellzahl [x 10 ⁶]													
		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h
K	# 1	0,54	0,57	1,02	2	AS	0,53	0,48	1,44	1,58	181a	1,02	0,87	1,69	3,18
	# 2	0,84	0,88	0,98	1,86		0,77	0,94	1,05	1,44		0,58	1,09	0,95	1,86
	# 3	0,84	0,78	1,09	1,94		0,65	1,14	1,62	1,76		0,63	1,07	1,12	2,24
MW		0,69	0,67	1,06	1,97		0,65	0,85	1,37	1,59		0,74	1,01	1,25	2,42
SD		0,17	0,16	0,06	0,07		0,12	0,34	0,29	0,16		0,24	0,12	0,39	0,68
t-Test vs. K							0,48	0,64	0,18	0,05		1	0,09	0,43	0,34
t-Test vs. AS												0,58	0,52	0,7	0,16

Angegeben sind die Einzelwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzwerte.

9.7 Zellproliferation nach miR-181a Überexpression

HL-60 (Abb. 36)		Zellzahl [x 10 ⁶]													
		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h
K	# 1	0,83	0,71	0,93	1,85	AS	0,7	0,74	1,28	1,85	181a	0,99	0,64	0,75	1,48
	# 2	0,46	0,6	1,05	1,53		0,55	0,66	1,22	1,85		0,63	0,36	0,57	1,13
	# 3	0,35	0,6	0,98	1,31		0,53	0,64	0,95	1,38		0,61	0,52	0,75	1,06
MW		0,59	0,66	0,96	1,58		0,59	0,68	1,15	1,69		0,74	0,51	0,69	1,22
SD		0,25	0,06	0,06	0,27		0,09	0,05	0,18	0,27		0,21	0,14	0,1	0,22
t-Test vs. K							0,79	0,45	0,24	0,59		0,37	0,24	0,02	0,17
t-Test vs. AS												0,36	0,15	0,03	0,08

Angegeben sind die Einzelwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzwerte.

9.8 Metabolische Aktivität nach miR-181a Inhibition

REH (Abb. 25)		A (650 nm – 450 nm)												
		24h	48h	72h		24h	48h	72h		24h	48h	72h		
K	# 1	0,18	0,30	0,46	AS	0,21	0,34	0,48	181a	0,17	0,28	0,40		
	# 2	0,26	0,34	0,77		0,13	0,32	0,52		0,15	0,25	0,49		
	# 3	0,15	0,24	0,34		0,13	0,22	0,33		0,15	0,18	0,30		
MW		0,20	0,29	0,53		0,16	0,29	0,44		0,16	0,23	0,39		
SD		0,06	0,05	0,22		0,05	0,06	0,10		0,01	0,05	0,09		
t-Test vs. K							0,44	0,99	0,60		0,37	0,23	0,42	
t-Test vs. AS												0,96	0,29	0,57

Angegeben sind die Einzelwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzwerte.

9.8 Metabolische Aktivität nach miR-181a Inhibition

MOLT-4 (Abb. 25)		A (650 nm – 450 nm)										
		24h	48h	72h		24h	48h	72h		24h	48h	72h
K	# 1	0,15	0,44	0,57	AS	0,15	0,42	0,58	181a	0,15	0,36	0,50
	# 2	0,15	0,46	0,60		0,15	0,22	0,29		0,15	0,55	0,67
	# 3	0,23	0,43	0,62		0,23	0,36	0,56		0,23	0,36	0,51
MW		0,18	0,44	0,60		0,15	0,33	0,48		0,19	0,42	0,56
SD		0,04	0,01	0,03		0,09	0,10	0,16		0,06	0,11	0,10
t-Test vs. K						0,69	0,20	0,32		0,83	0,82	0,55
t-Test vs. AS										0,61	0,35	0,50

Angegeben sind die Einzelwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzwerte.

Jurkat (Abb. 25)		A (650 nm – 450 nm)										
		24h	48h	72h		24h	48h	72h		24h	48h	72h
K	# 1	0,20	0,48	0,75	AS	0,13	0,32	0,55	181a	0,10	0,26	0,45
	# 2	0,20	0,45	0,69		0,15	0,30	0,63		0,12	0,38	0,55
	# 3	0,16	0,40	0,67		0,16	0,36	0,80		0,20	0,43	0,79
MW		0,19	0,44	0,70		0,15	0,32	0,66		0,14	0,35	0,60
SD		0,02	0,04	0,04		0,02	0,03	0,13		0,05	0,09	0,18
t-Test vs. K						0,08	0,02	0,60		0,28	0,23	0,40
t-Test vs. AS										0,88	0,60	0,65

Angegeben sind die Einzelwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzwerte.

9.9 Metabolische Aktivität nach miR-181a Überexpression

REH (Abb. 37)		A (650 nm – 450 nm)										
		24h	48h	72h		24h	48h	72h		24h	48h	72h
K	# 1	0,07	0,14	0,14	AS	0,09	0,13	0,13	181a	0,06	0,12	0,12
	# 2	0,09	0,18	0,32		0,11	0,22	0,35		0,10	0,24	0,28
	# 3	0,15	0,18	0,27		0,20	0,24	0,35		0,19	0,22	0,35
MW		0,10	0,17	0,25		0,13	0,19	0,28		0,12	0,20	0,25
SD		0,04	0,02	0,09		0,06	0,06	0,13		0,07	0,06	0,12
t-Test vs. K						0,49	0,52	0,75		0,80	0,53	0,94
t-Test vs. AS										0,72	0,97	0,82

Angegeben sind die Einzelwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzwerte.

MOLT-4 (Abb. 37)		A (650 nm – 450 nm)										
		24h	48h	72h		24h	48h	72h		24h	48h	72h
K	# 1	0,26	0,17	0,38	AS	0,27	0,34	0,48	181a	0,28	0,43	0,59
	# 2	0,29	0,32	0,41		0,23	0,33	0,36		0,28	0,47	0,53
	# 3	0,22	0,30	0,41		0,40	0,46	0,67		0,34	0,34	0,63
MW		0,26	0,27	0,40		0,30	0,38	0,50		0,30	0,41	0,58
SD		0,04	0,08	0,02		0,09	0,08	0,15		0,03	0,06	0,05
t-Test vs. K						0,51	0,16	0,37		0,17	0,07	0,02
t-Test vs. AS										0,94	0,57	0,47

Angegeben sind die Einzelwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzwerte.

9.9 Metabolische Aktivität nach miR-181a Überexpression

HL-60 (Abb. 37)		A (650 nm – 450 nm)											
		24h	48h	72h		24h	48h	72h		24h	48h	72h	
K	# 1	0,55	1,15	2,14	AS	0,60	1,25	1,95	181a	0,49	1,01	1,57	
	# 2	0,60	1,31	2,19		0,70	1,50	2,44		0,46	0,95	1,61	
	# 3	0,64	1,04	1,90		0,56	0,89	1,49		0,41	0,72	1,14	
MW		0,60	1,17	2,07		0,62	1,22	1,96		0,46	0,89	1,44	
SD		0,05	0,14	0,16		0,07	0,31	0,48		0,04	0,15	0,26	
t-Test vs. K						0,66	0,83	0,73		0,02	0,08	0,03	
t-Test vs. AS										0,04	0,20	0,19	

Angegeben sind die Einzelwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzwerte.

9.10 Apoptoserate nach miR-181a Inhibition

REH (Abb. 26)		Prozent [%] Annexin V positiver Zellen													
		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h
K	# 1	14,98	9,88	9,58	9,24	AS	12,01	13,16	14,76	11,42	181a	12,84	14,8	22,82	13,74
	# 2	15,68	12,96	11,72	10,18		14,08	13,22	11,94	12,18		13,92	15,3	11,52	13,52
	# 3	13,55	13,88	14,87	15,06		11,62	11,14	12,53	18,06		14,96	8,17	18,82	9,03
MW		14,74	12,24	12,06	11,49		12,57	12,51	13,08	13,89		13,91	12,76	17,72	12,10
SD		1,09	2,09	2,66	3,12		1,32	1,18	1,49	3,63		1,06	3,98	5,73	2,66
t-Test vs. K							0,05	0,46	0,28	0,08		0,14	0,25	0,16	0,06
t-Test vs. AS												0,25	0,08	0,32	0,11

Angegeben sind die Einzelwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzwerte.

9.10 Apoptoserate nach miR-181a Inhibition

MOLT-4 (Abb. 26)		Prozent [%] Annexin V positiver Zellen													
		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h
K	# 1	5,64	11,3	17,28	6,58	AS	15,44	11,6	15,22	9,76	181a	7,42	12,68	21,2	22,64
	# 2	22,16	13,34	13,16	12,04		24,06	16,02	8,32	9,62		24,54	9,74	8	5,92
	# 3	15,77	11,28	10,63	10,68		6,41	7,53	11,32	9,55		11,27	9,60	19,15	8,9
MW		14,52	11,97	13,69	9,77		15,30	11,72	11,62	9,64		14,41	10,67	16,12	12,49
SD		8,33	1,18	3,36	2,84		8,83	4,25	3,46	0,11		8,98	1,74	7,10	8,92
t-Test vs. K							0,61	0,62	0,50	0,91		0,88	0,60	0,94	0,63
t-Test vs. AS												0,74	0,44	0,75	0,64

Angegeben sind die Einzelwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzwerte.

Jurkat (Abb. 26)		Prozent [%] Annexin V positiver Zellen													
		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h
K	# 1	10,08	14,92	7,26	5,84	AS	16,24	19,08	15,7	8,66	181a	9,28	19,38	17,92	6,18
	# 2	6	12,48	10,08	7,84		10,32	16,36	13,38	11,46		14,54	25,38	15,4	10,32
	# 3	21,1	16,72	7,96	5,98		30,6	14,56	9,98	5,98		26,72	21,58	9,22	4,74
MW		12,39	14,71	8,43	6,55		19,05	16,67	13,02	8,70		16,85	22,11	14,18	7,08
SD		7,81	2,13	1,47	1,12		10,43	2,28	2,88	2,74		8,95	3,04	4,48	2,90
t-Test vs. K							0,43	0,34	0,09	0,31		0,55	0,03	0,15	0,79
t-Test vs. AS												0,79	0,07	0,73	0,52

Angegeben sind die Einzelwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzwerte.

9.11 Apoptoserate nach miR-181a Überexpression

HL-60 (Abb. 38)		Prozent [%] Annexin V positiver Zellen													
		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h
K	# 1	30,34	23,52	24,24	17	AS	18,5	23,24	16,06	18,5	181a	22,42	28,74	23,35	21,37
	# 2	26,4	27	25,86	19,95			29,06		17,12		28	20,5	22,39	19,93
	# 3	20,55	17,37	19,98	22,1		15,99	7,96	16,43	13,28		19,74	10,44	13,79	12,75
MW		25,76	22,63	23,36	19,68		17,25	20,09	16,25	16,30		23,39	19,89	19,84	18,02
SD		4,93	4,88	3,04	2,56		1,77	10,90	0,26	2,70		4,21	9,17	5,26	4,62
t-Test vs. K							0,08	0,74	0,05	0,19		0,56	0,68	0,39	0,62
t-Test vs. AS												0,12	0,98	0,36	0,61

Angegeben sind die Einzelwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzwerte.

9.12 Nekroserate nach miR-181a Inhibition

REH (Abb. 26)		Prozent [%] Annexin V und PI positiver Zellen														
		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h	
K	# 1	15,34	18,9	10,66	10	AS	16,48	15,22	14,04	11,82	181a	15,42	13,32	18,8	15,12	
	# 2	13,76	14,66	14,38	13,46			15,62	18,42	17,94		12,84	17,4	21,5	15	12,9
	# 3	14,11	20,81	18,88	14,34		13,44	21,73	17,96	6,97		17,07	20,10	13,18	7,59	
MW		14,40	18,12	14,64	12,60		15,18	18,46	16,65	10,54		16,63	18,31	15,66	11,87	
SD		0,83	3,15	4,12	2,29		1,57	3,26	2,26	3,14		1,06	4,37	2,87	3,87	
t-Test vs. K							0,27	0,99	0,33	0,79		0,29	0,91	0,24	0,40	
t-Test vs. AS												0,78	0,91	0,77	0,35	

Angegeben sind die Einzelwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzwerte.

9.12 Nekroserate nach miR-181a Inhibition

MOLT-4 (Abb. 26)		Prozent [%] Annexin V und PI positiver Zellen													
		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h
K	# 1	5,06	58,88	49,56	41,94	AS	11,06	50	35,38	34,22	181a	10,68	60,18	27,46	32,22
	# 2	23,36	25,98	31,92	24,46		27,34	48,08	29,06	50,58		30,9	28,28	24,04	22,54
	# 3	24,96	44,27	26,56	47,49		37,14	46,81	40,63	30,83		29,37	47,47	38,79	44,31
MW		17,79	43,04	36,01	37,96		25,18	48,30	35,02	38,54		23,65	45,31	30,10	33,02
SD		11,06	16,48	12,03	12,02		13,17	1,61	5,79	10,56		11,26	16,06	7,72	10,91
t-Test vs. K							0,72	0,76	0,66	0,52		0,68	0,94	0,28	0,63
t-Test vs. AS												0,91	0,81	0,25	0,28

Angegeben sind die Einzelwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzwerte.

Jurkat (Abb. 26)		Prozent [%] Annexin V und PI positiver Zellen													
		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h
K	# 1	10,74	19,7	10,76	6,74	AS	14,96	27,12	23,28	12,96	181a	17,48	32,92	26,2	10,8
	# 2	8,52	18,44	16,32	9,18		16,06	26,1	20,5	13,8		21,9	45,44	20,58	11,74
	# 3	7,48	28,9	17,38	10,38		5,7	27,34	17,5	12,52		4,04	31,2	12,56	10
MW		8,91	22,35	14,82	8,77		12,24	26,85	20,43	13,09		14,47	36,52	19,78	10,85
SD		1,67	5,71	3,56	1,85		5,69	0,66	2,89	0,65		9,30	7,77	6,86	0,87
t-Test vs. K							0,42	0,30	0,10	0,04		0,41	0,07	0,35	0,18
t-Test vs. AS												0,74	0,16	0,89	0,03

Angegeben sind die Einzelwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzwerte.

9.13 Nekroserate nach miR-181a Überexpression

HL-60 (Abb. 38)		Prozent [%] Annexin V und PI positiver Zellen														
		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h	
K	# 1	19,14	22,46	22,52	12,61	AS	18,64	21,06	22,93	14,73	181a	17,84	15,5	22,91	22,44	
	# 2	14,3	25,68	21,95	10,85			16,08	17,04	10,88			14,58	30,38	19,16	19,52
	# 3	18,47	22,69	24,09	15,59			12,07	17,94	20,25		14,76		14,67	17,78	24,63
MW		17,30	23,61	22,85	13,02		15,36	18,36	20,07	13,46		15,70	21,22	22,23	20,40	
SD		2,62	1,80	1,11	2,40		4,65	2,52	2,95	2,23		1,86	8,01	2,80	1,77	
t-Test vs. K							0,66	0,05	0,24	0,83		0,44	0,66	0,75	0,02	
t-Test vs. AS												0,93	0,61	0,41	0,01	

Angegeben sind die Einzelwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzwerte.

9.14 CD4-Expression nach miR-181a Inhibition in MOLT-4

MOLT-4 (Abb. 28)		Prozent positiver Zellen [%]													
		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h
K	# 1	50,4	39,6	47,0	49,1	LNA - AS	48,0	41,0	45,0	48,5	LNA - 181a	50,7	43,5	45,9	50,9
	# 2	40,4	48,2	48,8	52,5		48,6	44,8	44,0	57,1		50,1	52,3	49,8	62,5
	# 3	60,2	48,0	67,1	54,6		54,9	46,0	66,9	56,3		58,0	49,6	72,2	61,6
MW		50,3	45,3	54,3	52,1		50,5	43,9	52,0	54,0		52,9	48,5	56,0	58,3
SD		9,9	4,9	11,1	2,8		3,8	2,6	12,9	4,7		4,4	4,5	14,2	6,5
t-Test vs K							0,98	0,57	0,64	0,69		0,71	0,45	0,88	0,23
t-Test vs. AS												0,51	0,22	0,74	0,40

AS	# 1	50,0	40,1	43,0	46,5	181a	52,1	42,6	45,6	46,1
	# 2	50,6	48,4	47,1	57,3		57,5	53,1	53,1	61,9
	# 3	60,9	48,3	68,2	54,2		62,0	51,1	70,6	55,3
MW		53,8	45,6	52,8	52,7		57,2	48,9	56,4	54,4
SD		6,1	4,8	13,5	5,6		5,0	5,6	12,8	7,9
t-Test vs. K		0,64	0,93	0,89	0,88		0,36	0,44	0,84	0,67
t-Test vs. AS							0,50	0,48	0,75	0,77

Angegeben sind die Einzelwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzwerte. Bei der Berechnung der p-Werte gegenüber der unspezifischen Kontrolle (AS) wurden die Proben verglichen, welche mit der gleichen Art ASO transfiziert wurden (LNA AS vs. LNA 181a usw.).

9.14 CD4-Expression nach miR-181a Inhibition in MOLT-4

MOLT-4 (Abb. 29)		Mittlere Fluoreszenzintensität													
		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h
K	# 1	31,95	34,92	39,38	29,54	LNA - AS	27,22	32,23	35,66	37,81	LNA - 181a	35,44	43,30	44,86	33,56
	# 2	26,00	28,17	37,36	43,08		24,15	24,32	30,15	40,89		27,12	32,19	41,02	65,88
	# 3	31,34	21,19	29,5	30,69		26,02	20,68	30,16	31,55		32,54	27,29	40,33	41,08
rMFI (MW)							0,87	0,92	0,91	1,03		1,06	1,23	1,20	1,33
rMFI (SD)							0,05	0,06	0,11	0,09		0,04	0,06	0,14	0,20
t-Test vs. AS												0,008	0,003	0,055	0,097

AS	# 1	30,59	35,10	36,44	29,04	181a	33,62	39,38	39,12	27,16
	# 2	25,68	27,84	35,34	52,98		33,15	35,34	44,89	64,35
	# 3	30,99	20,59	31,96	30,61		33,65	23,88	36,07	31,45
rMFI (MW)		0,98	0,99	0,98	1,07		1,13	1,17	1,14	1,15
rMFI (SD)		0,02	0,02	0,09	0,14		0,12	0,07	0,13	0,31
t-Test vs. AS							0,157	0,045	0,166	0,723

Angegeben sind die einzelnen Messwerte, sowie die Mittelwerte, Standardabweichung und Signifikanzwerte der relativen Mittleren Fluoreszenzintensität. Bei der Berechnung der p-Werte gegenüber der unspezifischen Kontrolle (AS) wurden die Proben verglichen, welche mit der gleichen Art ASO transfiziert wurden (LNA AS vs. LNA 181a usw.).

9.15 CD4-Expression nach miR-181a Überexpression in MOLT-4

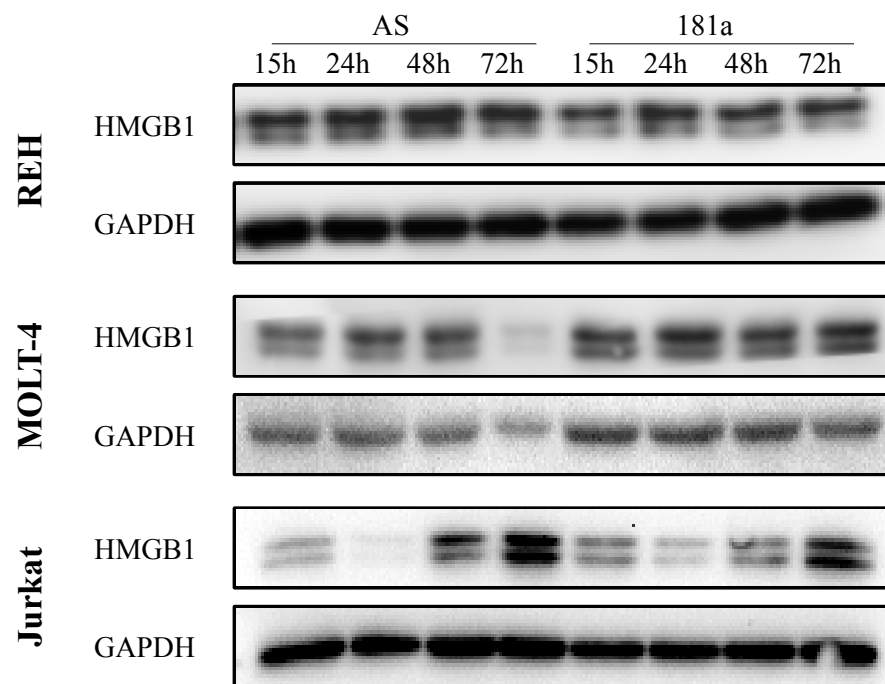
MOLT-4 (Abb. 39)		Prozent positiver Zellen [%]													
		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h
K	# 1	90,51	94,57	92,55	92,12	AS	82,09	95,42	93,08	92,95	181a	92,19	86,,8	92,04	92,68
	# 2	82,86	83,68	65,98	82,4		83,45	82,03	66,21	83,82		85,15	82,74	68,48	83,29
	# 3	85,89	90,18	86,62	83,97		86,70	90,77	87,43	95,68		86,30	91,95	87,84	84,39
MW		86,42	89,48	81,72	86,16		87,41	89,41	82,24	90,82		87,88	87,02	82,79	86,79
SD		3,85	5,48	13,95	5,22		4,36	6,8	14,17	6,21		3,78	4,64	12,57	5,13

Angegeben sind die Einzelwerte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzwerte.

MOLT-4 (Abb. 39)		Mittlere Fluoreszenzintensität													
		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h		15h	24h	48h	72h
K	# 1	100,57	191,8	124,13	234,11	AS	110,69	204,61	128,07	241,5	181a	111,40	202,89	122,99	238,69
	# 2	70,5	92,63	38,9	126,02		72,56	84,93	39,67	132,09		76,65	89,17	41,36	123,2
	# 3	79,01	135,72	121,25	62,13		84,65	150,54	136,16	67,22		79,82	142,40	124,83	60,72
rMFI (MW)							1,07	1,03	1,06	1,05		1,07	1,02	1,03	0,99
rMFI (SD)							0,04	0,10	0,06	0,02		0,05	0,05	0,04	0,03
t-Test vs. AS												0,86	0,61	0,39	0,28

Angegeben sind die einzelnen Messwerte, sowie die Mittelwerte, Standardabweichung und Signifikanzwerte der relativen Mittleren Fluoreszenzintensität.

9.16 HMGB1-Expression nach miR-181a Inhibition mit unmodifizierten ASO



9.16 Material

Chemikalien

2-Propanol	JT Baker
Agarose	Biozym
Ammoniumchlorid	Merck
Ammoniumpersulfat	Sigma
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Roth
BSA	Serva
Chloroform	JT Baker
DMSO	Sigma
dNTP	Pharmacia Biotech
EDTA	Merck
Ethanol	Universität Rostock, Zentralapotheke
Ethidiumbromid	Stratagene
Glycin	Merck
Methanol	Labscan Analytical Sciences
Milchpulver	Roth
Natriumchlorid	Roth
Propidiumiodid	Sigma
Protein Assay	BioRad
Salzsäure	Universität Rostock, Zentralapotheke
SDS	Serva
TEMED	Sigma
Tris Base	Roth
Triton X - 100	Sigma
Trypanblau	Sigma
WST-1	Roth
β -Mercatoethanol	Merck

Kits, Fertiglösungen und Enzyme

2 x qPCR Master Mix Plus dNTP	Eurogenetec
Annexin V FITC Apoptosekit	BD Pharmingen
Biocoll	Biochrom
ECL Plus Chemilumineszenz	Amersham

Complete-Mini EDTA free	Roche
Glycogen	Ambion
miRNA TaqMan Kit für hsa-miR-142-3p hsa-miR-181a RNU 48	Applied Biosystems
MiRNeasy Mini Kit	Qiagen
PBS	Biochrom
PhosSTOP	Roche
PKH26 GL	Sigma
Ponceau S	Serva
Proteinstandard (Kaleidoskope)	BioRad
Random Primer	Invitrogen
RNA – free DNase Set	Qiagen
Rotiphorese NF – Acrylamid / Bis - Lösung	Roth
Superscript II	Invitrogen
TaqMan miRNA Reverse Transkription Kit	Applied Biosystems
Turbo DNA - free	Ambion

Nährmedien und Antibiotika

alpha MEM - Medium	Biochrom
DMEM - Medium	Biochrom
FKS	PAA Laboratories
IMDM mit L - Glutamin	PAA Laboratories
Penicillin / Streptomycin (10000 U/ml)	Gibco
RPMI – 1640 - Medium	Biochrom

Geräte und Materialien

6- und 96-Lochplatten (für Zellkultur)	Nunc
96-Lochplatte (für PCR)	Applied Biosystems
ABI Prism 7000 SDS	Applied Biosystems
Agarosegelkammer	BioRad
AutoMACS u. zubehör	Miltenyi Biotec
Brutschrank BB6220 Cu	Heraeus
C 1000 Thermal Cycler	BioRad
Chambered Coverglass System	Nunc

Elektroporationsküvetten	BioRad
FACS Calibur	Becton & Dickinson
Geldokumentationssystem	Herolab
Gene Pulser	BioRad
Image Station 440	Kodak
Mikroskop Eclipse TE 200	Nikon
Mini Protean Tetra Cell	BioRad
Mirkoskop LSM 410	Carl Zeiss Jena
Nanodrop 100	Peqlab
Neubauerzählkammer	Blau Brand
PVDF - Membran	Amersham
Semi -Dry-Blotter, Fastblot B34	Biometra
Zellkulturflaschen, 25, 75 und 175 cm ²	Nunc

Puffer und Lösungen

1 x TBST (pH 8,0)	Natriumchlorid	1,5 M
	Tris Base	0,1 M
	Triton X - 100	0,5 vol %
Anode I Puffer (pH 10,4)	Tris Base	0,03 M
	Methanol	20 vol %
Anode II Puffer (pH 10,4)	Tris Base	0,3 M
	Methanol	20 vol %
Kathodenpuffer (pH 9,4)	Tris Base	0,025 M
	6 - Aminohexansäure	0,04 M
	Methanol	20 vol %
RIPA – Lyse - Puffer	Tris (pH 7,4)	50 mM
	Natriumchlorid	150 mM
	SDS	0,1%
	NP 40	1 vol %
2 x Probenpuffer	SDS	0,15 M
	Glycerin	22 vol %
	EDTA	1 mM
	Sammelgelpuffer	25 vol %
	Bromphenolblau	1 Spatelspitze
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	Tris Base	0,5 M
	SDS	0,14 mM

Trenngelpuffer (pH 8,8)	Tris Base	1,5 M
	SDS	0,14 mM
Elektrophoresepuffer	Tris Base	75 mM
	Glycin	0,5 M
	SDS	10 mM
0,5 x TBE	Tris Base	0,45 M
	Borsäure	0,045 M
	EDTA	0,1 M

Oligonukleotide

Primer HMGB1	Primer Vorwärts	5'-AGT GAG AGC CGG ACG GG-3'
	Primer Rückwärts	5'-CCT TTG CCC ATG TTT AGT TAT TTT TC-3'
	Sonde	6-FAM-CTG GGC GAC TCT GTG CCT CGC T-TAMRA
PCR Glucuronidase	Primer Vorwärts	5'-TGG TGC TGA GGA TTG GCA-3'
	Primer Rückwärts	5'-AGC GTG TCG ACC CCA TTC-3'
	Sonde	6-FAM-TGC CCA TTC CTA TGC CAT CGT GTG T-TAMRA
MiRNA - Inhibition	Unspezifisches ASO	5'-GUGU AACACGUCUAUACGCCCA-3'
	Anti - hsa-miR-181a	5'-ACUCACCGACAGCGUUGAAUGUU-3'
MiRNA - Mimic Überexpression	Unsp. Oligonukleotid	All stars negativ Control Qiagen
	hsa-miR-181a	5'-AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU-3'

Antikörper

MicroBeads	Anti-CD34	Mitenyi Biotec
	Anti-CD14	Mitenyi Biotec
	Anti-FITC	Mitenyi Biotec

Durchflusszytometrie	Antigen	Fluorochrom	Hersteller	Bestellnummer
	IgG1	FITC	Becton & Dickinson	345815
	IgG1	PE	Becton & Dickinson	345816
	CD3	PE	Becton & Dickinson	345765
	CD4	PE	Becton & Dickinson	345769
	CD5	PE	Becton & Dickinson	345782
	CD14	PE	Becton & Dickinson	345785
	CD19	FITC	Becton & Dickinson	345776
	CD20	FITC	Becton & Dickinson	345792
	CD33	PE	Becton & Dickinson	345799
	CD34	FITC	Becton & Dickinson	345801
	CD38	PE	Becton & Dickinson	345800
	CD45	FITC	Becton & Dickinson	345808
	CD69	FITC	Becton & Dickinson	347823
	HLA-DR	FITC	Becton & Dickinson	347400

Western Blot	Antikörper	Klon	Wirt	Hersteller
	pAkt Ser 473	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling
	Akt	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling
	PTEN	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling
	GAPDH	monoklonal	Maus	Invitrogen
	HMGB1	HAP46.5	Maus	Biozol
	anti-Maus-HRP	polyklonal	Ziege	Zymed
	anti-rabbit-HRP	polyklonal	Ziege	Cell Signaling

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Christian Junghanss für die Überlassung des sehr interessanten Themas und seine ständige Diskussionsbereitschaft während der Bearbeitungszeit.

Besonders danken möchte ich auch Frau Dr. Sandra Lange für die gute wissenschaftlich Betreuung und ihre Bereitschaft, mir immer mit Rat und Tat zu Seite zu stehen.

Ganz besonders danke möchte ich auch Catrin Schult für die gemeinsamen Diskussionen über die Tiefen der Molekular- und Zellbiologie. Manches Ergebnis sähe ohne sie anders aus...

Sabine Ruck möchte ich für die Einführung in die medizinische Statistik und die italienische Lebensweise danke.

Das sehr angenehme Arbeitsklima in der Gruppe hat mir während der Bearbeitungszeit sehr geholfen. Ohne Anett, Anne, Catrin, Doreen, Gudrun und Kristin und die regelmäßigen Mittags- und Kaffeepausen wäre so mancher Tag düsterer gewesen als er war. Danke dass ihr mich aufgebaut habt!

Sabine, Catrin, Christian: danke für die unvergesslichen Momente in Italien. Sie waren trotz des damit verbundene Stresses immer ein Lichtblick im Laboralltag. Chi fa di meno riceverà più complimenti!

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung und Motivation während der gesamten Promotion und auch den Rest des Alltags.