

miRNA Expression bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) und funktionelle Analyse der miR-100

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

von
Dipl.-Ing. (FH) Stephanie Brundiers
geboren am 23.03.1983 in Löningen

2010

Referent: Prof. Dr. Michaela Scherr, MHH
Korreferent: Prof. Dr. Christopher Baum, MHH
Tag der Promotion: 03. August 2010

*Darin besteht das Wesen der Wissenschaft.
Zuerst denkt man an etwas, das wahr sein könnte.
Dann sieht man nach, ob es der Fall ist
und im allgemeinen ist es nicht der Fall.*

Bertrand Russel (1872-1970) brit. Philosoph u. Mathematiker

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung differenziell exprimierter mikroRNAs (miRNAs) bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) und deren Funktion in hämatopoetischen Zellen. MiRNAs sind endogen exprimierte, regulatorische RNAs, die posttranskriptionell die Genexpression regulieren und bei der Tumorentstehung und Tumorprogression eine Rolle spielen. Spezielle miRNAs wurden als Tumorsuppressoren oder Onkogene beschrieben und als onkogene miRNAs (Onkomirs) bezeichnet. Anhand von miRNA Expressionsmustern kann man maligne und gesunde Gewebe klassifizieren. Im Rahmen der Arbeit wurde untersucht, (i) ob man anhand der miRNA Expression zwischen normalen Vorläuferzellen und Zellen der AML diskriminieren kann, und (ii) ob zytogenetisch definierte AML Subgruppen anhand von miRNA Expressionsmustern klassifiziert werden können.

Anschließend wurden für Kandidaten-miRNAs in einer bioinformatischen Analyse Zielgene bestimmt und bekannten intrazellulären Signalwegen (*Down-stream* Regulatoren) zugeordnet. In den Fokus der Untersuchungen rückte die miR-100 und die PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade, welche Überleben, Wachstum und Proliferation von Zellen reguliert. Mehrere Gene dieses Signalweges besitzen potenzielle Zielsequenzen für die miR-100. Zur Validierung dieser potenziellen Zielgene wurden Immunoblots durchgeführt. Weiterhin wurde die direkte miRNA:mRNA Bindung mittels Reportergen Assay bestimmt.

Eine funktionelle Analyse der miR-100 in hämatopoetischen Zellen zeigte einen deutlichen Proliferationsnachteil dieser Zellen unter einer erhöhten Expression der miRNA. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass diese Zellen sensitiver auf das Immunsuppressivum Rapamycin reagieren als Kontrollzellen.

Vor dem Hintergrund, dass eine miRNA mehrere Zielgene innerhalb einer Signalkaskade regulieren kann, scheint hier ein neuer potenzieller Therapieansatz gefunden. Durch die gezielte „Steuerung“ eines Signalweges mit nur einer miRNA kann eine zusätzliche medikamentöse Therapie unterstützt und gefördert werden. Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg könnte so einen neuen therapeutischen Ansatz zur Behandlung von Leukämien darstellen.

Schlagerworte: Akute Leukämie, mikroRNA, PI3K/Akt/mTOR-Signalweg

Summary

This work deals with the identification of microRNAs (miRNAs) differentially expressed in acute myeloid leukemia, as well as their functional analysis in hematopoietic cells. MiRNAs are endogenously expressed, regulatory RNAs which regulate gene expression post-transcriptionally. These small regulators play a role in oncogenic development and progression. Several miRNAs are described as tumor suppressors or oncogenic miRNAs (Oncomirs). Furthermore, expression of specific miRNAs is shown to correlate with malignant or healthy tissues.

Initially miRNA expression profiles were analyzed to discriminate (i) between acute myeloid leukemia (AML) and normal progenitor cells and (ii) between cytogenetically defined subgroups of AML and normal CD34+ cells.

Candidate miRNAs were analyzed by a bioinformatic screen for identification of target genes and their involvement in intracellular signaling pathways (*Down-stream* regulators). Further investigations focused on miR-100 and the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, which regulate cell survival, cell growth and proliferation. Many players of this pathway are potential targets of miR-100. Immunoblots were used to validate these miRNA targets. In addition, reporter gene assays were performed to show the direct miRNA:mRNA interaction.

Overexpression of miR-100 in some hematopoietic cell lines resulted in reduced proliferation. Furthermore, miR-100 overexpressing cells were more sensitive towards the immunosuppressant drug rapamycin, as compared to control cells.

One miRNA may regulate many target genes within a signaling cascade and can function as new therapeutic. Regulation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway by miR-100 may offer a new therapeutic possibility for the treatment of leukemias.

Keywords: acute leukemia, microRNA, PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	5
1.1. RNA Interferenz	5
1.1.1. Geschichte der RNAi	5
1.1.2. Prinzip der RNAi	6
1.1.3. mikroRNAs	8
1.1.4. mikroRNAs und maligne Erkrankungen	11
1.1.5. mikroRNAs und ihre Zielgene	12
1.2. Lentiviraler Gentransfer	13
1.3. Die Hämatopoese	15
1.4. Leukämie	16
1.4.1. Entstehung und Einteilung der Leukämie	16
1.4.2. Akute Myeloische Leukämie	17
1.5. Mammalian Target of Rapamycin	18
1.5.1. Die PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade	19
1.5.2. Die PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade und maligne Erkrankungen	22
1.5.3. mTOR-Inhibitoren	23
1.6. Zielsetzung	25
2. Materialien und Methoden	27
2.1. Materialien	27
2.1.1. Antibiotika	27
2.1.2. Antikörper	27
2.1.3. Bakterien	28
2.1.4. Chemikalien	28
2.1.5. Desinfektionsmittel	29
2.1.6. Enzyme	30

2.1.7.	Gebrauchslösungen	30
2.1.8.	Geräte	31
2.1.9.	Komplettsysteme	32
2.1.10.	Medien	32
2.1.11.	Oligonukleotide	33
2.1.12.	Primer für die PCR	33
2.1.13.	Primer für die Sequenzierung	33
2.1.14.	Software	34
2.1.15.	Vektoren/Plasmide	34
2.1.16.	Verbrauchsmaterialien	34
2.1.17.	Zelllinien	35
2.2.	Molekularbiologische Methoden	36
2.2.1.	miChip Mikroarray	36
2.2.2.	Reverse Transkription	37
2.2.3.	Real-Time PCR	38
2.2.4.	miR-qRT-PCR	40
2.2.5.	Kinasierung von Oligonukleotiden	43
2.2.6.	Verdau von Plasmid-DNA	43
2.2.7.	Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten über Agarosegelelektrophorese	44
2.2.8.	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	45
2.2.9.	Ligation	46
2.2.10.	Sequenzierung	46
2.2.11.	Klonierung lentiviraler Vektoren für die mikroRNA Überexpression	48
2.2.12.	Klonierung der Reportergen Vektoren	49
2.2.13.	Kultivierung von Bakterien	50
2.2.14.	Herstellung kompetenter Zellen	50
2.2.15.	Transformation	51
2.2.16.	Plasmid-Mini-/Maxipräparation durch Alkalische Lyse	52
2.2.17.	DNA-Isolierung mittels QIAamp DNA Blood Mini Kit	53
2.2.18.	Isolierung von RNA mittels TRIzol	53
2.2.19.	Konzentrationsbestimmung von gelöster DNA/RNA	54
2.3.	Zellbiologische Methoden	55
2.3.1.	Kultivierung humaner/muriner Zelllinien	55
2.3.2.	Kyrokonservierung von Zellen	56

2.3.3.	Behandlung mit RAD001/ Rapamycin	57
2.3.4.	BrdU Zellproliferationsassay	58
2.3.5.	Generierung lentiviraler Überstände	59
2.3.6.	Transduktion humaner/muriner Zelllinien	60
2.3.7.	Transfektion durch Lipofektion	61
2.3.8.	Luziferase Assay	62
2.3.9.	Durchflusszytometrie	63
2.4.	Proteinbiochemische Methoden	64
2.4.1.	Herstellung von Gesamtzell-Lysaten	64
2.4.2.	Proteinbestimmung nach Bradford	65
2.4.3.	Sodiumdodecyl-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	66
2.4.4.	Western Blot	68
2.5.	In-Silico Analysen	70
2.5.1.	Statistische Analysen mittels R und Bioconductor	70
2.5.2.	Analyse von mikroRNA Zielgenen	72
2.5.3.	Analyse der Signalwege	73
3.	Ergebnisse	75
3.1.	Patientenkohort	75
3.2.	RNA Qualität	76
3.3.	miChip Mikroarray	77
3.3.1.	Vergleich der Kontrollgruppen	78
3.3.2.	Vergleich der AML mit PB-MNC	79
3.3.3.	Vergleich von miChip und miR-qRT-PCR	81
3.4.	Vergleich der AML Subgruppen mit PB-MNC	82
3.4.1.	AML mit normalen Karyotyp	83
3.4.2.	AML mit komplexen Karyotyp	84
3.4.3.	AML mit Monosomie 7	86
3.4.4.	AML mit Inversion 16	87
3.4.5.	AML mit Translokation (8;21)	88
3.4.6.	Zusammenfassung des Vergleiches der AML Subgruppen mit PB-MNCs	89
3.5.	Analyse von mikroRNA Zielgenen	91
3.5.1.	Vorhersage von mikroRNA-Zielgen-Interaktionen	91
3.5.2.	Analysen mittels GenMAPP2	94
3.5.3.	Analyse der PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade	94

3.6. Transduktionseffizienzen	97
3.7. Valdierung der miR-100 Zielgene	98
3.7.1. Western Blot Analysen	98
3.7.2. Luziferase Assay	103
3.7.3. mRNA Expression nach miR-100 Überexpression	105
3.8. Effekte der miR-100 auf verschiedene Zelllinien	106
3.9. Effekte von Rapamycin	110
3.10. Effekte von Rapamycin und miR-100	111
3.11. Effekte der miR-100 auf HuH-7 Zellen	112
3.11.1. Überexpression der miR-100	112
3.11.2. miR-100 dosisabhängige Proliferation der HuH-7	114
4. Diskussion	117
4.1. mikroRNAs bei der AML	117
4.2. miR-100	122
4.3. miR-100 Zielgene	123
4.4. miR-100 und die PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade	125
4.5. Zusammenfassung und Ausblick	127
5. Anhang	131
5.1. Script zur Analyse mittels R und Bioconductor	131
5.2. Ergebnisse der Zielgenanalyse der miR-100 mittels TargetScan	133
5.3. Ergebnisse der Zielgenanalyse der miR-100 mittels PicTar	134
5.4. Bindungsstellen ausgewählter Zielgene	135
Literatur	A
A. Lebenslauf, Publikationsliste, Erklärung zur Dissertation	Q

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
-7	Monosomie 7
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
ALLN	N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal
AML	Akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
as	Antisense (engl.); Gegenstrang
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	Bacterial alkaline phosphatase (engl.); bakterielle Alkaline Phosphatase
bp	Basenpaar
BrdU	Bromodeoxyuridine
BSA	Bovines Serum Albumin (engl.); Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CBF	Core binding factor (engl.)
CD	Cluster of Differentiation (engl.); Unterscheidungsgruppen
CDS	Coding site (engl.); kodierende Region
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CFU	Colony-forming unit (engl.); Kolonie bildende Einheit
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
ctrl	Control (engl.); Kontrolle
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium; Zellkulturmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA / DNS	Desoxyribonucleic acid (engl.); Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	Doppelsträngige DNA
dsRNA	Doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence (engl.)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay (engl.); Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence activated cell sorting (engl.); Durchflusszytometrie
FC	Fold change (engl.); quantitativer Unterschied
FCS	Fetal calf serum (engl.); fötales Kälberserum
FDR	False discovery rate (engl.); Fehlerkorrektur
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor (engl.)
GFP	Grünes fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulocyte/macrophage colony stimulating factor (engl.)
GTP	Guanosintriphosphat
HDAC	Histondeacetylase
HDACI	Histondeacetylase-Inhibitor
IFN	Interferon
IL	Interleukin
inv(16)	Inversion 16
IRES	Internal ribosomal entry site (engl.); interne ribosomale Eintrittsstelle

Abkürzung	Bedeutung
kb	Kilobasen
KM	Knochenmark
M-CSF.....	Macrophage colony stimulating factor (engl.)
MFI	Mean fluorescence intensity (engl.); mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minute
miRNA	MikroRNA
MOI	Multiplicity of Infection (engl.); Multiplizität der Infektion
mRNA	Messenger RNA (engl.); Boten-RNA
nd	Not determined (engl.); nicht bestimmt
ns	Nicht signifikant
nt	Nukleotide
LB	Lysogeny broth (engl.); Bakterienmedium
LNA	Locked nucleic acid (engl.); verbrückte Nukleinsäure
OAS	Oligoadenylatsynthetase
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame (engl.); offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMNC	Peripheral blood mononuclear cells (engl.); mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate buffered saline; physiologischer Puffer
PCR	Polymerase chain reaction (engl.); Polymerasekettenreaktion
Ph	Philadelphia Chromosom
Pen / Strep	Penicillin / Streptomycin
PI	Propidiumiodid; Lebend-tot-Farbstoff
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
Pol	Polymerase
PTGS	Post transcriptional gene silencing (engl.); Posttranskriptionelle Genstilllegung
RIN	RNA Integrity Number (engl.)
RNA / RNS	Ribonucleic acid (engl.); Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	Rounds per minute (engl.); Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute; Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SCF	Stem cell factor (engl.)
SD	Standard deviation (engl.); Standardabweichung
SDS	Sodium... (engl.); Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SFFV	Spleen focus forming virus (engl.)
siRNA	Small interfering...(engl.); kleine interferierende RNA
shRNA	Small hairpin...(engl.); kleine Haarnadel RNA
SOB	Super Optimal Broth (engl.)
ssDNA	Single-stranded...(engl.); einzelsträngige DNA
ssRNA	Single-stranded.... (engl.); einzelsträngige RNA
t(8;21)	Translokation (8;21)
TAE	Tris-Acetat-EDTA (Pufferlösung)
TBE	Tris-Borat-EDTA (Pufferlösung)
TE	Tris-EDTA (Pufferlösung)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
Tm	Schmelztemperatur
TOP	Terminal Oligopyrimidine

Abkürzung	Bedeutung
TP	Transformationspuffer
TSA	Trichostatin A
TSPP	Tetrasodium....(engl.); Tetranatrium Pyrophosphat
tv	Transcript variant (engl.); Transkript
U	Unit
ü. N.	Über Nacht
UTR	Untranslated region (engl.); Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
VSV.G	Vesicular Stomatitis Virus - Glycoprotein G
(v/v)	Volume per volume (engl.); Volumen pro Volumen
WPRE	Woodchuck hepatitis B post-transcriptional regulatory element (engl.)
wt	Wildtyp
(w/v)	Weight per volume (engl.); Gewicht pro Volumen
∅	Durchschnitt

1. Einleitung

1.1. RNA Interferenz

1.1.1. Geschichte der RNAi

RNA Interferenz (RNAi) ist ein natürlicher hochkonservierter, posttranskriptioneller Mechanismus zur Beeinflussung der Genexpression einzelner Gene in eukaryotischen Zellen. Im Laufe der Evolution entstand die RNAi als Schutzmechanismus des Genoms gegen Angriffe von Viren oder anderen genetisch mobilen Elementen, wie z.B. Transposons [1].

Entdeckt wurde das Phänomen der RNAi, als Forscher 1990 beabsichtigten die Blütenfarbe von Petunien durch zusätzliche Kopien des Gens für Dihydroflavonol-Reduktase zu verbessern. Das Ergebnis dieses Experimentes war unerwartet. Statt intensiveren Pinktönen zeigten die Pflanzen verminderte Farben, einige waren sogar schneeweiß. Einige Jahre später konnte nachgewiesen werden, dass das Dihydroflavonol-Reduktase Gen auf transkriptioneller Ebene abgeschaltet und die produzierte mRNA schnell abgebaut wird [2]. Pflanzen nutzen diesen Mechanismus, um die Virusreplikation nach einem Infekt zu hemmen. Hierbei binden doppelsträngige RNAs (dsRNAs) sequenzspezifisch an die Virus mRNA, welche dann zerschnitten wird. In Pilzen wurde ein ähnlicher Effekt, das sogenannte *Quelling* beschrieben [3].

Im Jahre 1998 beschrieben A.Fire und C.Mello den Prozess der Gen-Stillegung durch dsRNA im Nematoden Wurm *C.elegans*. Sie entdeckten, dass weder die Injektion von *sense* noch *antisense* RNA, jedoch von dsRNA eine effektive, sequenzspezifische Degradation von cytoplasmatischer mRNA der gleichen Sequenz wie die dsRNA erzielen kann [4]. Im Jahre 2006 wurde ihnen für diese Entdeckung der Nobelpreis verliehen. Heutzutage wird die RNAi routinemäßig genutzt um Gene stillzulegen und so ihre Funktion im Genom zu analysieren.

1.1.2. Prinzip der RNAi

Im ersten Schritt des RNAi Mechanismus werden lange dsRNAs durch ein RNase III Enzym namens Dicer in ca. 21 bis 25 nt lange *small interfering* RNA (siRNA) Duplexe geschnitten, die typische 2-nt Überhänge am 3'-Ende enthalten. Dicer enthält eine N-terminale ATP-Domäne, zwei RNase III-Typ Domänen und ein dsRNA Motiv. Die siRNA Duplexe werden in den Multiprotein RNA-*Induced Silencing Complex* (RISC) eingebunden. Am 5'-Ende unphosphorylierte siRNAs werden vor diesem Prozess durch eine endogene Kinase phosphoryliert, da die Phosphorylierung für eine Inkorporation in den RISC zwingend erforderlich ist [5]. Nach diesem Schritt wird die siRNA mithilfe einer Helikase unter ATP Verbrauch entwunden. Der *sense*-Strang wird degradiert. Der thermodynamisch stabilere Strang verbleibt am RISC und führt diesen als *antisense*-Strang zur komplementären mRNA-Zielsequenz (s. Abb. 1.1). RISC setzt sich aus Argonaute-Proteinen zusammen, die alle eine PAZ und PIWI Domäne enthalten. PAZ weist eine Affinität zur siRNA auf, die C-terminale PIWI Domäne besitzt Endonukleaseaktivität und zerschneidet die Zielsequenz. Die Ziel-mRNA wird an nur einer einzigen Position im Zentrum der Duplexregion gespalten, 10 nt vom 5'-Ende der siRNA entfernt [5]. Die mRNA Bruchstücke werden schnell von Nukleasen abgebaut. Somit kann eine Proteinsynthese nicht mehr stattfinden.

Es gibt verschiedene Mediatoren des RNAi Prozesses. In ersten Experimenten von A. Fire wurden ca. 200-1000 nt lange dsRNAs verwendet. Diese wurden mittels Mikroinjektion in die Zellen von Nematoden injiziert und führten zu einer Reduktion der mRNA und somit zur Reduktion des entsprechenden Proteins [6]. Es konnte gezeigt werden, dass nur wenige Moleküle notwendig sind, um diesen Effekt zu erzielen [7]. In Säugerzellen ist der Gebrauch von langen dsRNAs jedoch problematisch, da die Zellen mit einer Interferonantwort auf die Moleküle reagieren. Die Proteinkinase PKR und die 2',5'-Oligoadenylatsynthetase (2',5'-OAS) werden aktiviert und regulieren IFN- β . Eine Aktivierung des Jak-Stat Signalweges und eine global erhöhte Expression von IFN-stimulierenden Genen sind das Ergebnis [8]. Im Jahr 2002 konnte gezeigt werden, dass man die Interferonantwort durch kleine RNA Moleküle umgehen kann. Mit einer Größe von ca. 25 nt sind diese zu klein, um die Aktivierung von PKR und 2',5'-OAS zu initiieren [9]. Der Nutzen solcher siRNAs ist in tierischen Zellen beschränkt, denn im Gegensatz zu *C.elegans* und *Drosophila* fehlen ihnen die Mechanismen zur Amplifizierung und Erhaltung der siRNAs im Organismus. Einmal in die Zelle injiziert, wird die siRNA durch die Proliferation aus den Zellen eliminiert. Daher kann man nur transiente Effekte erzielen.

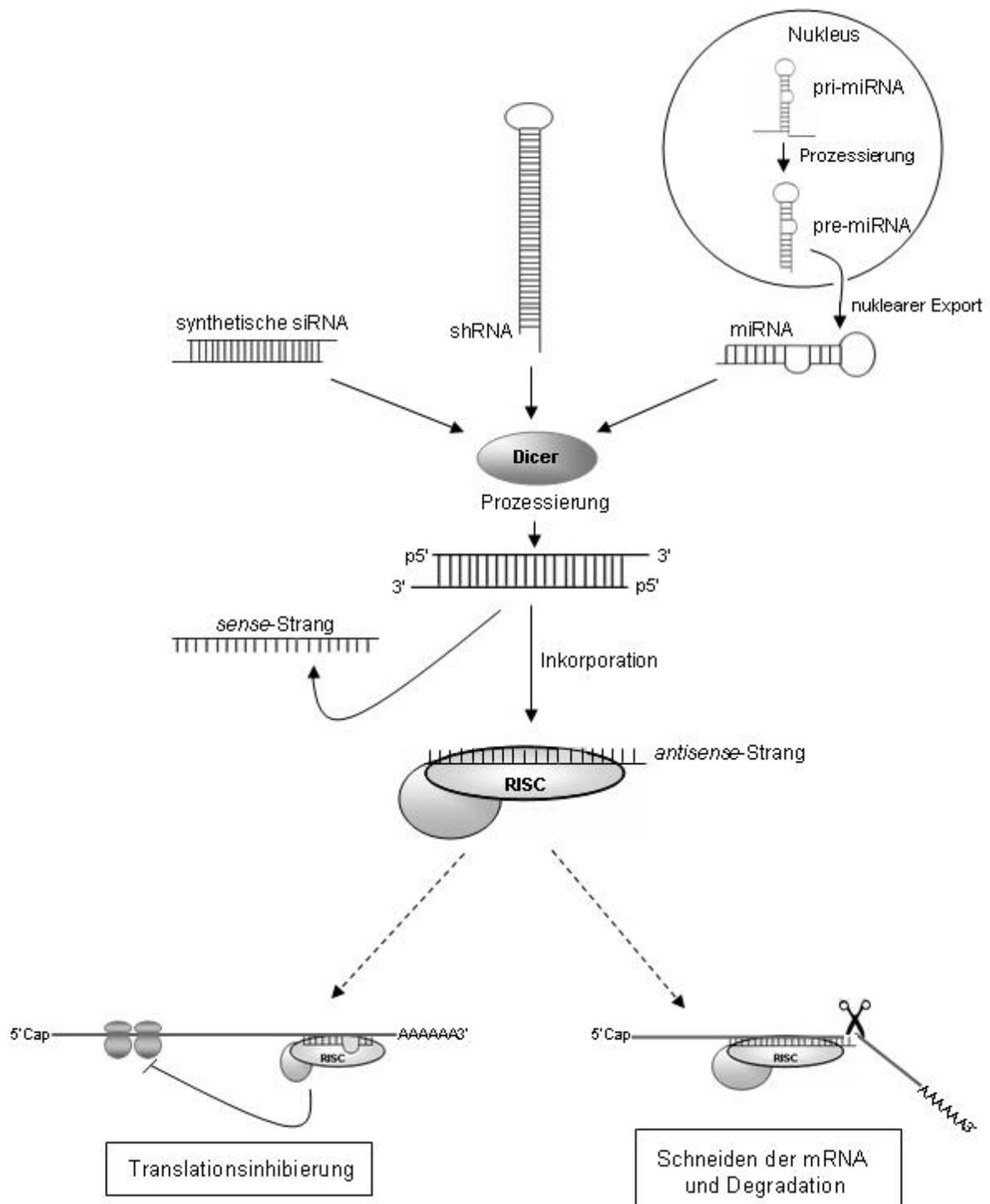


Abbildung 1.1.: Der RNAi Mechanismus. shRNA und miRNA werden durch Dicer prozessiert. Synthetische siRNAs werden direkt im RISC inkorporiert. Die Ziel-mRNA wird entweder degradiert oder die Translation gehemmt. Verändert nach [10].

Neben doppelsträngigen siRNA (vgl. Abb. 1.1), können auch Polymerase III transkribierte *small hairpin* RNAs (shRNA) den RNAi Prozess initiieren. Diese shRNAs sind meist ca. 50 nt lang und besitzen die typischen 2-nt 3' Überhänge. Ein retro/lentiviraler Gentransfer entsprechender Vektoren ermöglicht die stabile Integration in das Zielgenom. Mithilfe von Vektoren, die eine vom Polymerase III (Pol III) Promotor exprimierte shRNA enthalten, kann man den kurzzeitigen Effekt von siRNAs umgehen. Die shRNA enthält einen der Zielsequenz identischen Strang und ist über einen 9 bp *Loop* mit dem *antisense*-Strang verbunden. Als Pol III Promotoren eignen sich H1 oder U6 Promotoren. Mittels dieser Vektoren werden kleine RNAs in einem hohen Maß und ohne einen Poly-A-Schwanz exprimiert. Weiterhin enthalten diese Vektoren ein Terminierungssignal bestehend auf fünf Thymidinen in einer Kette (T5) [11], [12]. Durch die verwendeten Promotoren kann man für viele Zelltypen eine hohe Aktivität erzielen. Weiterhin ermöglichen diese Vektoren eine induzierbare Expression der siRNA durch z.B. Doxycycline abhängige transkriptionelle Regulierung [13].

Mittels künstlicher mikroRNAs (miRNA), die von Polymerase II Promotoren exprimiert werden kann man ebenfalls den RNAi Prozess einleiten. Diese miRNAs werden im Kontext der miR30 oder miR155 Gene als Primärtranskripte durch Polymerase II Promotoren als mono- oder polycistronische Transkripte exprimiert [14]. Weiterhin besteht die Möglichkeit pri-miRNAs direkt über entsprechende Vektoren zu exprimieren. Dies erlaubt eine gewebespezifische und induzierbare Expression reifer miRNAs.

Jeder der RNAi Mediatoren tritt an einer anderen Stelle in den RNAi Prozess ein (vgl. Abb. 1.1). siRNAs werden direkt in die Zelle transfiziert und bedürfen keiner weiteren Prozessierung durch Dicer. Dadurch erzielt man schnell einen kurzzeitigen Effekt. Im Gegensatz zur siRNA können sh/miRNAs durch viralen Gentransfer stabil im Zielgenom exprimiert werden. Für eine vollständige Prozessierung müssen die Transkripte den kompletten RNAi Prozess durchlaufen.

1.1.3. mikroRNAs

Die Entdeckung der mikroRNAs (miRNAs) liegt mittlerweile fast zwanzig Jahre zurück. V. Ambros und Kollegen entdeckten, dass das Gen *lin-4*, welches in die Larvenentwicklung von *C.elegans* involviert ist, nicht für ein Protein, sondern für eine 22 nt lange RNA kodiert. Lin-4 wirkt als *antisense* translationaler Repressor von mRNAs, die für Proteine des Larvenentwicklungs-Weges kodieren. Man fand heraus, dass lin-4 komplementäre

Abschnitte zu Sequenzen der 3'UTR von lin-14 und lin-28 mRNAs besitzt. Dadurch kann die kleine RNA über einen RNAi Mechanismus die Translation blockieren und so die Bildung der Proteine Lin-14 und Lin-28 unterdrücken [15]. In den nächsten Jahren wurden immer mehr dieser kleinen miRNAs entdeckt. Neben der entwicklungspezifischen miRNA lin-4 entdeckte man eine Reihe gewebespezifischer kleiner RNAs. Die miR-1 wird z.B. vorwiegend im Gewebe des Gehirns exprimiert [16].

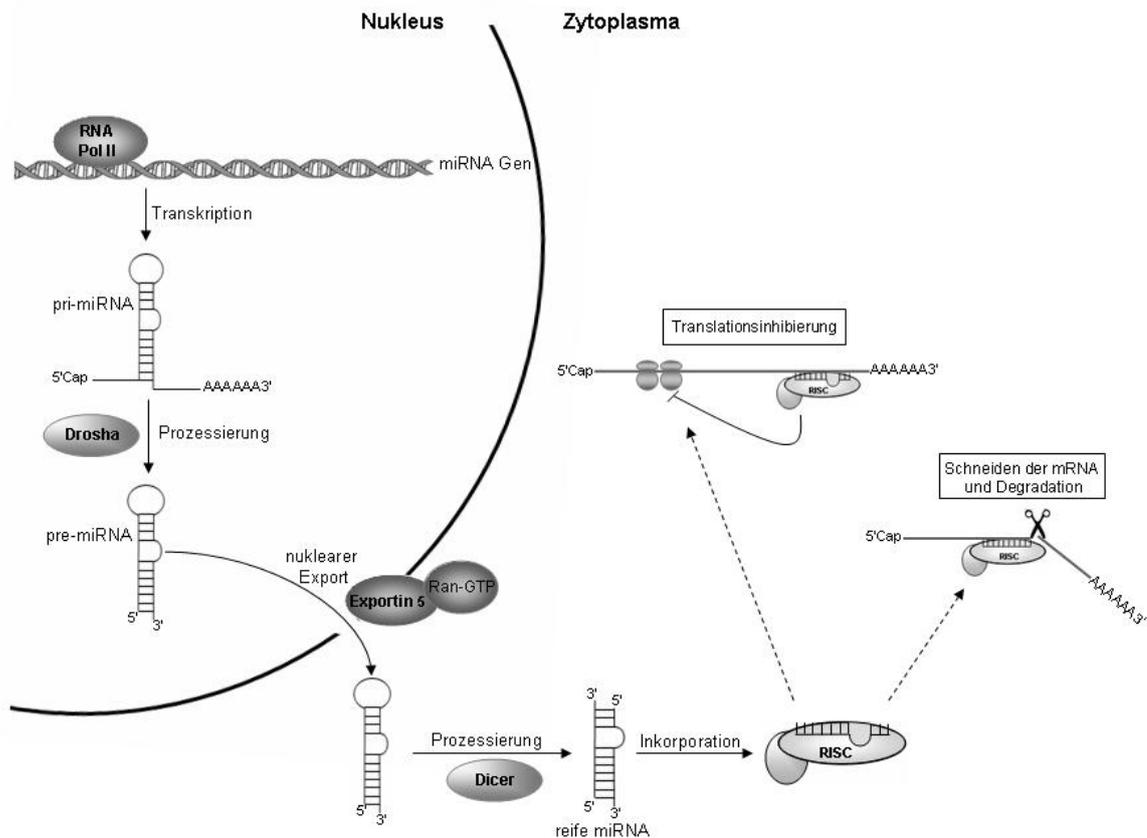


Abbildung 1.2.: miRNA Biogenese. Die pri-miRNA wird durch Drosha in die pre-miRNA prozessiert und über Exportin-5 in das Zytoplasma transferiert, wo sie durch Dicer geschnitten wird. Nachdem eine Helikase die miRNA:miRNA* Duplex entwunden hat, wird die reife miRNA in den RISC inkorporiert und fungiert als translationaler Repressor. Verändert nach [17].

miRNAs liegen im Genom häufig als intergenische, eigenständige Transkriptionseinheit vor. Ein geringerer Teil der miRNAs liegt in Intronregionen und wird zusammen mit den entsprechenden Genen koexprimiert. Neben singular vorliegenden miRNA gibt es häufig polycistronisch angeordnete miRNA Cluster, die aus zwei oder mehr miRNAs bestehen.

Diese ähneln sich häufig in ihrer Sequenz. Diese Art der genomischen Anordnung von miRNA Genen ermöglicht eine koordinierte Funktion mehrerer miRNAs [18]. Viele miRNAs sind hoch konserviert in verschiedenen Organismen.

Die Biogenese der miRNAs erfolgt über den RNAi Signalweg. Zunächst wird die miRNA im Nukleus durch eine RNA Polymerase II in ein Primärtranskript (pri-miRNA) prozessiert. Die nukleare RNase III Endonuklease „Drosha“ spaltet die pri-miRNA und es entsteht eine Vorläufer miRNA (pre-miRNA) mit Haarnadelstruktur (*stem-loop*). Drosha erkennt innerhalb der pri-miRNA die *Loop* Region und schneidet das Primärtranskript in die ca. 60-70 nt lange pre-miRNA (vgl. Abb. 1.2). Diese besitzt am 5'-Ende ein Phosphat und am 3'-Ende einen 2-nt Überhang. Exportin 5 erkennt den 2-nt Überhang am 3'-Ende der pre-miRNA und transportiert diese mithilfe von Ran-GTP aus dem Kern in das Zytoplasma [19]. Dort prozessiert eine weitere RNase III Endonuklease, Dicer, die pre-miRNA in eine 20-24 nt lange miRNA:miRNA* Duplex (vgl. Abb. 1.2). Diese wird durch eine Helikase entwunden. Der Strang, der eine schwächere Hybridisierungsstruktur an den 5'-Enden ausbildet wird in den RISC inkorporiert [20] [21]. Im RISC inkorporiert leitet die miRNA diesen Komplex zur Zielsequenz, welche sich meist in der 3'UTR der mRNA befindet. Dort kann die miRNA auf zwei Weisen wirken. Bei nicht vollständiger Komplementarität mit der Zielsequenz wird die Translation der mRNA unterdrückt. Dies ist der häufigste miRNA Wirkungsmechanismus in tierischen Zellen. Die Nukleotide 2-8 der 5' Region der miRNA, die sogenannte *Seed*-Sequenz, sind der essentielle Bestandteil für diesen Prozess [22]. Bei vollständiger Komplementarität kann die miRNA die Degradation der mRNA einleiten. Dazu wird die mRNA zwischen den Positionen 10 und 11, ausgehend vom 5'-Ende der miRNA, geschnitten und anschließend abgebaut. Dieser Mechanismus wird häufig bei Pflanzen festgestellt (s. Kapitel 1.1.1).

Die wichtigste Datenbank für miRNAs ist die miRBase [23]. Die erste Version der miR-Base erschien im Jahre 2002 mit 218 Einträgen. Mittlerweile besteht die 14. Auflage und beinhaltet weit über 10000 miRNAs aus 115 verschiedenen Spezies. Für das humane Genom sind über 1000 miRNAs gezählt. Dieser rasante Anstieg in der Identifizierung von miRNAs zeigt das Potenzial dieser kleinen Regulatoren. Weiterhin können miRNAs durch die geringe Größe ihrer „regulatorischen Einheit“, der *Seed*-Sequenz, eine Vielzahl von Genen regulieren. Dadurch wird die Komplexität der miRNA Forschung erhöht.

1.1.4. mikroRNAs und maligne Erkrankungen

Zur Charakterisierung und Klassifizierung maligner Erkrankungen kann man sich verschiedener Methoden bedienen. Häufig wird jedoch nach mRNA Expressionsprofilen klassifiziert. Seit der Entdeckung der miRNAs und ihres starken Einflusses auf Zellproliferation, -entwicklung und -differenzierung lag die Erforschung ihres Einflusses auf die Entstehung und Entwicklung von Tumoren nahe.

Mithilfe einer *Bead*-basierten Profilierungsmethode analysierten Lu et al. 217 miRNAs in 334 Proben, unter denen sich verschiedenste maligne Erkrankungen befanden [24]. In dieser Analyse konnte eine allgemein niedrigere Expression von miRNAs im Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe detektiert werden. Weiterhin konnten die Proben anhand ihres miRNA Expressionsprofils nach Entwicklungslinie und Differenzierungsstatus sortiert werden. Proben epithelialen Gewebes konnten z.B. deutlich von den übrigen Proben abgegrenzt werden. Innerhalb einer Gruppe von 73 ALL Patienten konnte man anhand der miRNA Expressionsprofile die verschiedenen Untergruppen BCR/ABL+, TEL/AML und MLL klassifizieren. Auf diese Weise wurde eine wesentlich akkuratere Charakterisierung der Tumore erzielt, als es mit mRNA Expressionsprofilen möglich war.

miRNAs haben ein großes Informationspotenzial im Bezug auf maligne Erkrankungen. Die globale Reduktion der miRNAs in malignen Erkrankungen reflektiert den Status der zellulären Differenzierung [24]. Nicht nur der Verlust, sondern auch erhöhte miRNA Expressionen konnten in verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden. Eine Analyse der miRNA Lokalisation zeigte, dass mehr als 50% der miRNAs in Regionen genetischer Instabilität, sogenannten *fragile sites*, lokalisiert sind. Diese Regionen sind häufig in chromosomale Veränderungen wie Translokationen, Deletionen oder Amplifikationen involviert (vgl. Tab. 1.1, S. 11) [25].

Tabelle 1.1.: Lokalisation verschiedener miRNAs in *fragile sites*, nach [25].

Chromosom	Größe, Mb	miRNA Cluster	Histotyp
11q24.1	1.725	let7a-2/miR-100	Brust, Lunge, Eierstock Krebs
13q14.3	0.54	miR-15a/miR-16-1	B-CLL
13.q31.3	7.15	miR-17/miR-18a/miR-19a/miR-20a/miR-19b-1/miR-92-1	Lymphom
9q22.32	1.45	let-7a-1/let-7f-1/let-7d	
3q21.3	0.75	miR-26a	Epithelialer Krebs
17q23	0.97	miR-21	Neuroblastom
17q22		miR-142	Prolymphozytische Leukämie

Viele miRNAs sind direkt an der Entstehung von malignen Erkrankungen beteiligt, andere können als Tumorsuppressoren oder Onkogene wirken. Reguliert eine miRNA ein Onkogen, wirkt diese als Tumorsuppressor. Durch Funktionsverlust der miRNA wird das Onkogen, bzw. die zugehörige mRNA nicht mehr reguliert. Dies resultiert in einer erhöhten Expression des onkogenen Proteins und führt zum malignen Phänotyp. Calin et al. analysierten die chromosomale Region 13q14, welche häufig durch eine Deletion in CLL Patienten entfernt ist. Hierbei stellten sie fest, dass diese Region für kein Protein, jedoch für ein polycistronisches miRNA Cluster der miRNAs miR-15a und miR-16-1 kodiert. Es zeigte sich, dass dieses Cluster in 70% der CLL Patienten deletiert war [26]. Später wurde entdeckt, dass diese beiden miRNAs das Onkogen Bcl2, welches die Apoptose inhibiert, regulieren [27]. Eine weitere Tumorsuppressor miRNA ist let-7. Durch Expression dieser miRNA in Lungenkrebszellen wird deren Proliferation unterdrückt [28]. Die let-7 reguliert das Onkogen Ras. Durch den Funktionsverlust der miRNA wird Ras nicht ausreichend kontrolliert und kann rezeptorunabhängig wirken. Dies führt zur unkontrollierten Proliferation der Zellen [29].

Im Gegensatz zu diesen Tumorsuppressor miRNAs befindet sich das miR-17-92 Cluster auf einer chromosomalen Region, die häufig in Lymphomen amplifiziert ist. Dies führt zu einer erhöhten Expression der miRNA, die so als „Onkomir“ wirken kann. Als Zielgene des miR-17-92 Cluster wurden die Tumorsuppressoren PTEN, p21 und Bim identifiziert. Eine zu starke Regulierung dieser Gene durch die miRNAs schränkt die Funktion der Tumorsuppressoren ein und das Tumorwachstum wird erleichtert [30]. Das miR-17-92 Cluster selbst wird in der CML, durch die Onkogene BCR/ABL und c-Myc positiv reguliert [31], [32].

1.1.5. mikroRNAs und ihre Zielgene

MiRNAs binden als kleine nicht-kodierende RNAs im Zusammenspiel mit dem RISC-Komplex an ihre Ziel-mRNA. Für die Degradation oder Hemmung der Translation an der Zielsequenz, ist eine Komplementarität von ca. 7-8 Nukleotiden zwischen miRNA und Ziel-mRNA ausreichend. Diese Nukleotide befinden sich am 5'-Ende der miRNA und bilden die sogenannte *Seed*-Sequenz. Aufgrund dieser kurzen homologen Sequenz besitzen die miRNAs die Möglichkeit eine Vielzahl von Genen zu regulieren. Weiterhin sind bislang über 10000 miRNAs für verschiedene Spezies in der miRBase registriert. Es gibt Vorhersagen, dass miRNAs über 30% der humanen Gene regulieren [33]. Dies macht die Suche nach miRNA-Zielgenen sehr umfangreich. Daher sind verschiedene Programme entwickelt worden, die über bestimmte Algorithmen nach Zielgenen suchen. Im wesentlichen sind die

Programme ähnlich aufgebaut. So spielt bei allen bekannten Vorhersageprogrammen (PicTar, TargetScan, MicroCosm) die Bindung der *Seed*-Sequenz an die 3'UTR der mRNA eine entscheidende Rolle. Die Länge der *Seed*-Sequenz fließt ebenfalls in die Berechnung von sogenannten *Bindingscores* ein. Eine Bindung über 8 Nukleotide wird einer von 7 Nukleotiden vorgezogen. Weiterhin berechnen viele Programme eine thermodynamische basierte Modellierung der RNA:RNA Duplex. Ein weiterer wichtiger Punkt zur Vorhersage ist die Konservierung der Zielsequenzen in orthologen Genen mehrerer Spezies [22]. Zur weiteren Zielgen Analyse erlauben viele Programme mittlerweile G:U-Wobble Basenpaarungen, welche jedoch negativ bewertet werden. Mehrere Bindungsstellen in der 3'UTR hingegen werden positiv bewertet. Bei Programmen, die auf diesen Vorhersage-Algorithmen aufbauen, erhält man im Allgemeinen 30-40% falsch positive Ergebnisse.

Eine Erweiterung dieser Vorhersage-Programme stellt RNA22 dar. Dieses Programm beruht nicht mehr auf der *Cross*-Spezies Konservierung. Es analysiert mit einem komplizierten Algorithmus statistisch signifikante Muster in der 3'UTR der Ziel-Sequenzen und sagt dann miRNAs vorher, die in diesen Mustern binden können. Zusätzlich ist die Faltungsenthalpie der Heteroduplex ein entscheidendes Kriterium für die Vorhersage einer Zielsequenz. Weiterhin ist das Programm nicht mehr auf die 3'UTR Bindungsstellen beschränkt, sondern analysiert auch die kodierende Sequenz und die 5'UTR. Es bestehen keine Limitierungen durch G:U Wobble Basenpaarungen oder der eigentlichen *Seed*-Sequenz, da man bis zu 2 ungepaarte Basen in dieser zulassen kann [34].

1.2. Lentiviraler Gentransfer

Der retro-/ lentivirale Gentransfer ist in den letzten Jahren zu einem beliebten Werkzeug der stabilen Expression von Genen in Zellen geworden. Prinzipiell werden dazu virale Überstände mit entsprechenden Vektoren in Helferzelllinien produziert. Die Zielzellen werden dann mit diesen Überständen transduziert. Der Virus integriert in das Genom der Zielzelle. Dadurch können die eingebrachten Gene stabil exprimiert werden. Durch diese Methode kann ein weites Spektrum an Zellen infiziert und somit genetisch verändert werden. Während Retroviren nur sich teilende Zellen infizieren können, haben Lentiviren die Fähigkeit auch ruhende Zellen zu infizieren. Dadurch erreicht man ein weites Spektrum an Zellen, das von einfachen hämatopoetischen Zellen bis hin zu Stammzellen reicht.

Lentiviren gehören zur Klasse der Retroviren. Die drei „Hauptgene“ *gag*, *pol* und *env* kodieren für die viralen Proteine. Diese Gene werden von der 5'LTR, dem Ψ - Verpa-

ckungssignal und dem 3'LTR umgeben. Die Viren besitzen sogenannte Transaktivatoren, die die Transkriptionseffizienz des LTR-Promotors erhöhen. *Tat* (*transactivator of transcription*) kodiert für solch einen Transaktivator, der an das TAR Element (*transactivation-responsive region*) bindet und so eine verbesserte Elongation bewirkt. Ein weiterer Transaktivator ist das *rev* Gen (*regulator of expression of viron proteins*). Es bindet an das RRE (*rev-responsive element*). Dadurch wird die virale RNA bevorzugt prozessiert, mit der Folge einer erhöhten Expressionseffizienz. Weiterhin besitzen Lentiviren sogenannte akzessorische Gene, *vif*, *vpr*, *vpu* und *nef*, deren Produkte die Regulation, Synthese und Prozessierung der viralen RNA steuern [35].

Lentivirale Überstände werden durch eine transiente Co-Transfektion dreier Plasmide in 293 Zellen produziert: (i) ein Verpackungsplasmid, (ii) ein Hüllplasmid und (iii) ein Transgenplasmid (vgl. Abb.1.3, S. 14). Mit den Jahren haben sich die lentiviralen Überstände

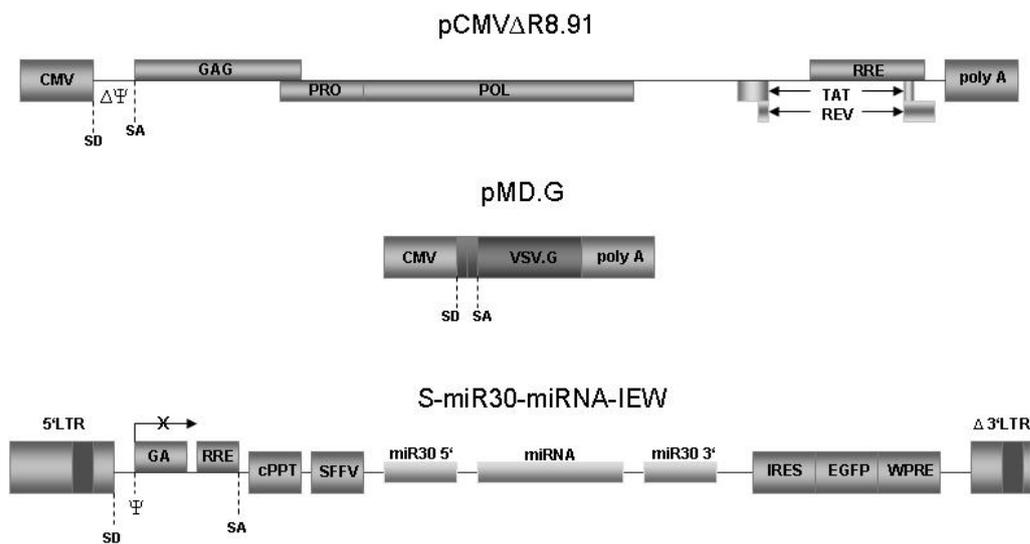


Abbildung 1.3.: Aufbau des Verpackungsplasmids pCMV Δ R8.91 und des Hüllplasmids pMD.G der Lentiviren sowie schematischer Aufbau des Transgenplasmids S-miR30-miRNA-IEW. Verändert nach [17]

verändert und die Sicherheit wurde erhöht. Die erste Generation der Verpackungsplasmide enthielt alle *gag* und *pol* Sequenzen, sowie die regulatorischen *tat* und *rev* Gene. Des Weiteren enthielten diese Vektoren noch die akzessorischen Gene. Diese akzessorischen, virulenten Gene wurden ohne Verlust an Infektionsfähigkeit bei der zweiten Generation lentiviraler Vektoren entfernt. Dies erhöhte die Sicherheit der Vektoren. Bei der dritten Generation lentiviraler Vektoren wurde das *rev* Gen über ein separates Plasmid exprimiert und die 5'LTR des transgenen Plasmids durch einen Tat-abhängigen konstitutiven

Promotor ersetzt. Zur weiteren Verbesserung der lentiviralen Vektoren wurden posttranskriptionell aktive Elemente, wie das WPRE (*woodchuck hepatitis B post-transcriptional regulatory element*) in die transgenen Plasmide eingefügt. WPRE kann die Genexpression durch Modifizierung der Polyadenylierung, RNA Export und Translation erhöhen. Für die Pseudotypisierung, d.h. die Spezifität der Viren für spezielle Zelltypen durch Interaktion der Virushüllproteine mit Zellmembranrezeptoren, hat sich das Glykoprotein VSV.G bewährt. Es scheint mit einem ubiquitären zellulären Rezeptor zu interagieren und ermöglicht so die Transduktion eines weiten Spektrums an Zellen. Zudem stabilisiert VSV.G die viralen Partikel gegenüber mechanischer Beanspruchung [35].

1.3. Die Hämatopoese

Während der normalen Hämatopoese reifen die Nachkommen pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark zu den verschiedenen Blutzellen heran. Aus der hämatopoetischen Stammzelle entwickeln sich durch asymmetrische Teilung die Vorläufer für die myeloischen und lymphatischen Linien des Blutes.

Verschiedene Wachstumsfaktoren und linienspezifische Transkriptionsfaktoren steuern die weitere Differenzierung in spezialisierte Blutzellen. Die Wachstumsfaktoren können die Zelldifferenzierung auslösen und die Reifung stimulieren. Weiterhin verhindern sie die Apoptose und beeinflussen die Funktion reifer Zellen. Zu den Wachstumsfaktoren zählen Kolonie-stimulierende Faktoren wie GM-CSF (*granulocyte/macrophage colony stimulating factor*), G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*) und M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*). Weiterhin können Interleukine, Erythropoetin und SCF (*stem cell factor*) die Hämatopoese steuern.

Die gemischte myeloische Vorläuferzelle differenziert in Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile und Basophile. Aus der lymphatischen Vorläuferzelle reifen die B-Zellen, T-Zellen und natürlichen Killerzellen [36]. Während die pluripotente Stammzelle sich ständig selbst erneuert, haben die ausgereiften Zellen des peripheren Blutes nur eine beschränkte Lebensdauer, diese reicht von einigen Stunden (Granulozyten) über Tage (Erythrozyten) bis hin zu Jahren (*memory*-T-Zellen und B-Zellen).

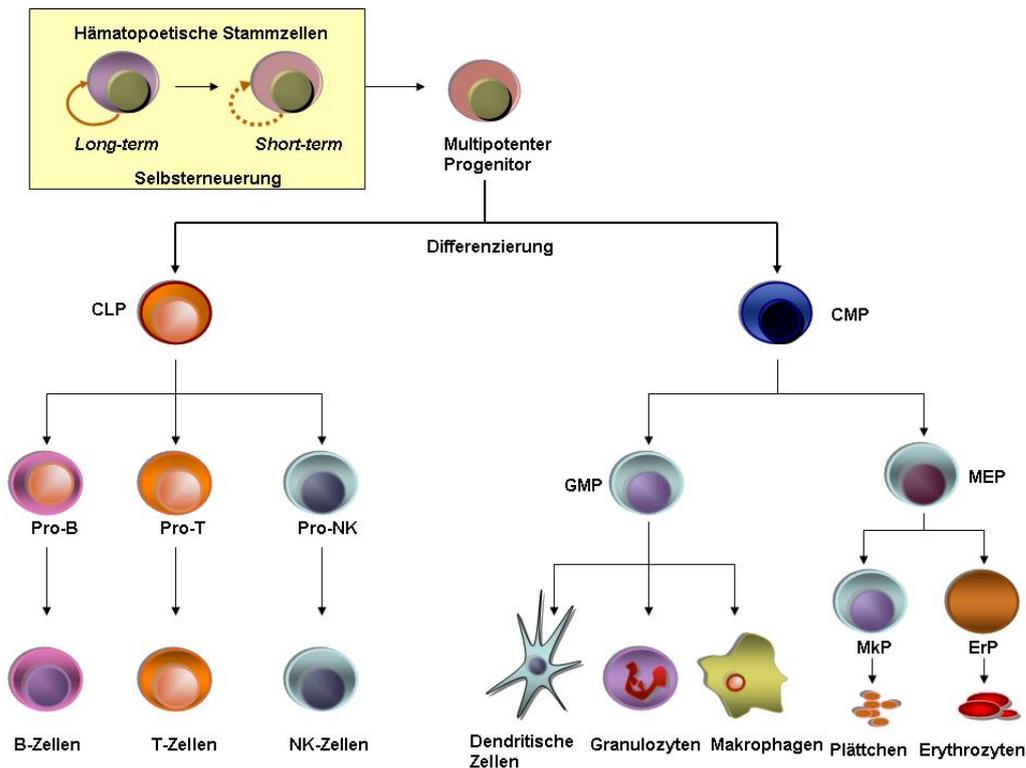


Abbildung 1.4.: Schematische Darstellung der Differenzierung der pluripotenten Stammzelle zu reifen Blutzellen. CLP (gemeinsamer lymphatischer Vorläufer), CMP (gemeinsamer myeloischer Vorläufer), GMP (Granulozyten/Monozyten Vorläufer), MEP (Megakaryozyten/Erythrozyten Vorläufer), MkP (Megakaryozyten Vorläufer), ErP (Erythrozyten Vorläufer) [37].

1.4. Leukämie

1.4.1. Entstehung und Einteilung der Leukämie

Als Leukämie bezeichnet man bösartige, klonale Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, die sich i.d.R. durch eine Akkumulation von Leukozyten und ihrer unreifen Vorläuferzellen auszeichnen. Aus einer abnormen Stammzelle kann im Knochenmark durch einen Differenzierungsblock eine leukämische Zellpopulation entstehen. Das Ausfallen verschiedener Tumorsuppressoren und/oder die Aktivierung von Onkogenen führt zu einem Ungleichgewicht von Zellsterben und Zellneubildung. Durch eine verminderte Apoptose, erhöhte Proliferation und Blockade der Zelldifferenzierung sammeln sich unreife Blutzellen, sogenannte Blasten, im Körper an. Dies führt zu einer Verdrängung und dem Fehlen

gesunder Zellen. Das Resultat sind typische Symptome wie die Anämie, die durch eine Reduktion von Erythrozyten hervorgerufen wird, oder häufige Infektionen durch den Ausfall funktionsfähiger Granulozyten. Leukämien bilden im Gegensatz zu soliden Tumoren keinen Zellverband. Die bösartigen Zellen befinden sich im Knochenmark und im peripheren Blut. Sie können andere Organe wie die Leber, Milz oder Lymphknoten infiltrieren [36].

Leukämien werden klinisch in vier verschiedene Gruppen unterteilt. Basierend auf dem Krankheitsverlauf und der Herkunft der malignen Zelle unterscheidet man zwischen akuten und chronischen sowie lymphatischen und myeloischen Leukämien. Akute Formen zeichnen sich durch eine Akkumulation unreifer Zellen, die an einem bestimmten Punkt einen Differenzierungsblock erfahren, aus. Chronische Leukämien hingegen entstehen vorwiegend aus einer Ansammlung weitgehend ausgereifter Zellen im Blut, entweder myeloischer oder lymphatischer Herkunft. Akute Leukämien sind durch starke Symptome gekennzeichnet und verlaufen äußerst aggressiv. Ohne Behandlung führen sie innerhalb weniger Wochen zum Tod. Einige Formen der akuten Leukämien sprechen sehr gut auf eine gezielte Therapie an und die Patienten können geheilt werden. Chronische Leukämien werden meist zufällig diagnostiziert, da anfangs kaum Symptome auftreten. Im Gegensatz zu den akuten Leukämien sind chronische Leukämien jedoch schlechter zu heilen [36].

Durch morphologische, immunpathologische und gegebenenfalls molekular- und zytogenetische Untersuchungen kann man die verschiedenen Leukämieformen weiter unterteilen und behandlungsrelevante Risikogruppen identifizieren. Die akute myeloische Leukämie (AML) soll im Folgenden näher erläutert werden.

1.4.2. Akute Myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie ist eine der häufigsten Krebserkrankungen des Blutsystems und mit ca. 33% aller Leukämien die häufigste Form. Die Inzidenz dieser Erkrankung steigt mit zunehmendem Alter an. Bei Kindern tritt die AML eher selten auf. Innerhalb der AML unterscheidet man zwischen der primären AML, die sich *de novo* entwickelt und der sekundären AML, die sich aus einer Vorerkrankung heraus oder deren Therapie entwickelt. Dies kann z.B. ein Myelodysplastisches Syndrom sein. Eine sekundäre AML kann auch nach einer Chemotherapie oder Bestrahlung entstehen.

Die AML lässt sich anhand genetischer, immunologischer und morphologischer Zellmerkmale definieren. Sie wird nach der FAB-Klassifikation (*French-American-British*) morphologisch in acht Untergruppen (M0-M7) unterteilt. Spezielle Chromosomenveränderungen

haben einen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung. Die Translokation t(8;21) gehört, neben der Inversion inv(16), zu den sogenannten *Core binding factor* (CBF) Leukämien. Die Prognose dieser Formen ist im Allgemeinen günstig und das Ansprechen auf Cytarabin sehr gut. Ungünstige genetische Abweichungen für den Verlauf der Krankheit sind mit einem Verlust des Chromosoms 7 (Monosomie 7) oder komplexen Veränderungen mehrerer Chromosomen assoziiert. Neben den chromosomalen Veränderung haben auch genetische Mutationen einen Einfluss auf die Prognose der AML. Zytogenetisch normale AML enthalten somatische Mutationen wie z.B. interne Tandem Duplikationen (ITD) oder Mutationen in Tyrosinkinase-Domänen. Flt3/ITD Mutationen finden sich bei 20% der AML Patienten. Die Mutation führt zu einer konstitutiven Kinaseaktivität von Flt3. Weitere Signaltransduktionswege werden dadurch aktiviert. Dies resultiert in einer unkontrollierten Proliferation der Zellen [38]. Weitere Mutationen einer zytogenetisch normalen AML können in den *npm1*, *cebpa*, *nras* oder *wt1* Genen vorkommen. NPM1 spielt in vielen zellulären Prozessen, wie Zellwachstum und Differenzierung, eine Rolle. Es reguliert die Aktivität und Stabilität des Tumorsuppressors p53. CEBPA ist ein Transkriptionsfaktor und zentrales Molekül der myeloischen Differenzierung. Ebenso wie CEBPA spielt WT1 in der Differenzierung myeloischer Zellen eine wichtige Rolle. Ein Funktionsverlust durch Mutationen resultiert in einer unkontrollierten Proliferation und Differenzierung. Häufige Mutationen dieser Gene sind Insertionen oder Deletionen [38].

Das Fusionsprotein AML1/ETO ist das Resultat einer Translokation t(8;21). AML1 ist Transkriptionsfaktor verschiedener hämatopoetischer Gene. Das Fusionsprotein führt zu einer veränderten Transkription dieser Gene. Dadurch entstehen abnormale Monozyten mit erhöhter zytoplasmatischer Granulozytät [39].

1.5. Mammalian Target of Rapamycin

Die Serin/Threonin Kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*), wurde 1994 erstmals als „Ziel von Rapamycin“ (*target of rapamycin*) beschrieben [40] [41]. Es ist ein 289 kDa großes Protein, welches in unterschiedlichen Proteinkomplexen vorliegt. Diese regulieren Zellwachstum, Zellproliferation und Überleben sowie die Proteinbiosynthese.

mTOR besteht aus einer katalytischen Kinase Domäne, einer FKBP12/Rapamycin Bindungsdomäne (FRB) und einer Repressor Domäne. Am N-Terminus besitzt mTOR 20 HEAT Wiederholungen (Huntington, EF3, PP2A, TOR1). Diese HEAT Wiederholungen sind in Protein-Protein Interaktionen involviert. C-terminal befinden sich die FAT

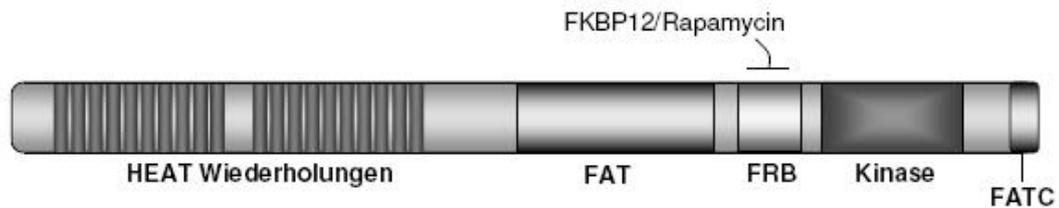


Abbildung 1.5.: Schematischer Aufbau von mTOR. Verändert nach [42].

(FRAP, ATM, TRAP) und FATC (FAT C-Terminus) Domänen (vgl. Abb. 1.5). Deletion einer einzigen Aminosäure in diesem Bereich führt zur kompletten Inaktivierung von mTOR. FAT und FATC interagieren zusammen und formen eine Konfiguration für mTOR, die zur Freilegung der katalytischen Domäne dient. Das C-terminale Ende von mTOR weist eine starke Homologie zur katalytischen Domäne von PI3K auf [42].

1.5.1. Die PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade

Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg wird durch eine Reihe verschiedener zellulärer Signale gesteuert. Dies können mitogene Wachstumsfaktoren, Hormone, wie Insulin oder Nährstoffe, wie Glukose und Aminosäuren sein. Ebenfalls beeinflussen Stress und Energiegehalt diesen Signalweg [43] [44] [45]. Der gesamte PI3K/Akt/mTOR-Signalweg wird über Rezeptoren in der Zellmembran gesteuert. IGFR (*insulin-like growth factor receptor*), PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) und EGFR (*epidermal growth factor receptor*) werden durch oben genannte Stimuli aktiviert und leiten die Signale direkt an Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) weiter. Eine Stimulierung des Signalweges durch Insulin aktiviert die Insulin Rezeptor Tyrosinkinase, welche IRS1/ IRS2 (*insulin receptor substrate 1/2*) phosphoryliert.

PI3K besteht aus einer katalytischen (p110) und einer regulatorischen (p85) Einheit. Es wurden verschiedene Untereinheiten identifiziert (p110 α , p110 β , p110 δ , p110 γ sowie p85 α und p85 β). Weiterhin fungiert eine p101 Untereinheit als regulatorische Einheit mit p110 γ . Mit einer der beiden SH2 (*src-homology-2*) Domänen der p85 regulatorischen Einheit bindet PI3K phosphoryliertes IRS und aktiviert die katalytische Untereinheit p110. Im nächsten Schritt phosphoryliert PI3K die D3 Position des Inositol Ringes von membrangebundenen PIP2 (*phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate*) zum PIP3 (*phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate*) [47].

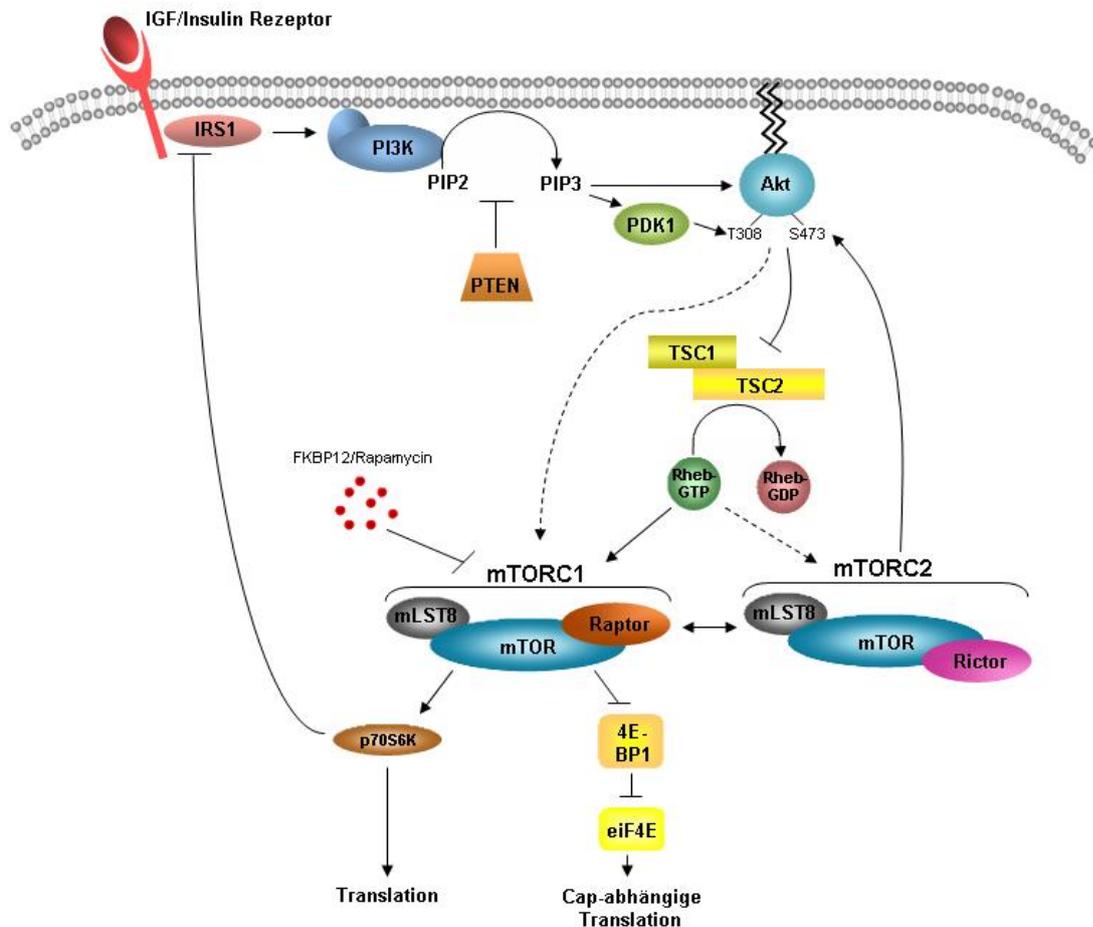


Abbildung 1.6.: Übersicht über die PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade. Verändert nach [46].

PIP3 bindet die PH (*pleckstrin homology*) Domäne der Serin/Threonin Kinasen Akt (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog*). PDK-1 (*3-phosphoinositide dependent protein kinase-1*) phosphoryliert Akt an Thr308 nach Bindung von PIP3 an die PH-Domäne. Für eine vollständige Aktivierung von Akt ist jedoch zusätzlich die Phosphorylierung an Ser473 notwendig. Verantwortlich hierfür ist PDK-2, heute bekannt als mTORC2, ein Komplex aus mTOR, Rictor, mLST8, mSIN1, PROTOR und DEPTOR [48] (s. Abb. 1.6). Die genauen Funktionen aller Bestandteile dieses Komplexes sind unklar.

Akt fördert das Zellüberleben durch Inhibierung der Apoptose. Es phosphoryliert und inaktiviert mehrere Zielproteine wie Bad, c-Raf, Caspase-9 und Forkhead Transkriptionsfaktoren (FOXO1, FOXO3A, FOXO4). Unphosphoryliertes FOXO ist im Nukleus lokalisiert und induziert die Transkription von Zielgenen, die vorwiegend in Zellzyklus- und Apoptoseprozesse involviert sind. Die Phosphorylierung der FOXOs durch Akt formt ei-

ne Bindungsstelle für 14-3-3 Chaperon Proteine. Dies führt zum aktiven Transport der FOXOs in das Zytoplasma und zur proteosomalen Degradation [49] [47].

Im PI3K/Akt/mTOR-Signalweg spielt Akt eine zentrale Rolle. Es kann mTOR, im Rapamycin-sensitiven Komplex mTORC1, direkt über Phosphorylierung an Ser2448 aktivieren [50]. Dieser Komplex setzt sich, neben mTOR aus den Proteinen Raptor, mLST8, PRAS40 und DEPTOR zusammen. PRAS40 wird ebenfalls durch Akt phosphoryliert und fungiert als negativer Regulator des Komplexes [51]. Weiterhin phosphoryliert Akt den Tuberin/Hamartin Komplex bestehend aus TSC1/TSC2 (*tuberous sclerosis 1/2*), einen Inhibitor von mTOR, und inaktiviert ihn dadurch. Die inhibitorische Wirkung von TSC1/TSC2 auf mTOR beruht auf der GTP-Hydrolyse von Rheb (*Ras homolog enriched in brain*), welches so inaktiviert wird. Eine Aktivierung von mTOR findet nicht statt [42] (s. Abb. 1.6).

mTORC1 reguliert über die Phosphorylierung von 4E-BP1 (*eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1*) und p70S6K (*ribosomal protein S6 kinase, 70kDa*) die Translation (s. Abb. 1.6). In der unphosphorylierten Form bindet 4E-BP1 an eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor-4E*). eIF4E ist die mRNA Cap-Bindungs-Untereinheit des eIF4F Komplexes (*eukaryotic translation initiation factor 4F*), welcher zusätzlich eIF4G (*eukaryotic translation initiation factor 4 gamma*) und eIF4A (*eukaryotic translation initiation factor 4A*) beinhaltet. Durch die Dissoziation von eIF4E aus dem eIF4F Komplex verliert dieser seine Funktion und die Cap-abhängige Translation wird unterbunden [42]. Die Hyperphosphorylierung von 4E-BP1 durch mTORC1 unterbindet die Bindung an eIF4E und die Cap-abhängige Translation wird gefördert. Die Cap-abhängige Translation ist oft mit Transkripten assoziiert, deren Translationsprodukte den Zellzyklus und die Proliferation in der G₁/S Phase des Zellzyklus kontrollieren. Hierzu gehören c-Myc und Cyclin-D1.

Die p70S6K Serin/Threonin Kinase phosphoryliert das S6 Protein der 40S ribosomalen Untereinheit und kontrolliert die Translation von 5' TOP (*Terminal Oligopyrimidine*) mRNAs. Diese 5' TOP mRNAs kodieren vorwiegend für ribosomale Proteine oder Elongationsfaktoren. Eine Phosphorylierung der p70S6K durch mTORC1 resultiert in einer erhöhten Translation von translations-assoziierten Proteinen [52].

Durch eine negative *Feedback*-Regulierung der PI3K, wird diese unter aktiviertem mTORC1 gehemmt. Eine Inhibierung von mTORC1 reduziert diesen inhibitorische *Feedback*-Mechanismus, der von p70S6K über IRS1 reguliert wird. Dadurch wird das PI3K Signal verstärkt [53]. Akt wird dann vermehrt an Thr308 und Ser473 phosphoryliert. Die

Gründe für die Phosphorylierung an Ser473 nach PI3K Aktivierung durch mTORC2 sind noch unklar [48].

1.5.2. Die PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade und maligne Erkrankungen

Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg übt durch die Regulation der Translation einen starken Einfluss auf die Proliferation von Zellen aus und steht häufig im Zusammenhang mit verschiedenen malignen Erkrankungen. Viele *upstream* Regulatoren von mTOR sind oft in verschiedenen Krebserkrankungen mutiert. Bei diesen Erkrankungen treten *Loss-of-function* Mutationen von PTEN (*phosphate and tensin homolog*) etwa in der gleichen Häufigkeit wie p53 Mutationen auf. Aktiviertes PTEN reguliert negativ PIP3 und kontrolliert so die PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade. Vor allem in hämatologischen Malignomen wird häufig eine Phosphorylierung von PTEN, mit der daraus resultierenden Inaktivierung des Proteins, beobachtet [54]. Dies wiederum führt zu einer erhöhten Akt Phosphorylierung. Aktiviertes Akt wird in ca. 50% aller *de novo* AML Erkrankungen detektiert und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert [55]. AML Zellen zeigen häufig eine autokrine Sekretion von IGF-1. Dies führt zur Stimulierung des IGF-1R (*insulin-like growth factor 1 receptor*) und somit zur Aktivierung von PI3K [49]. PI3K reguliert NF- κ B. Der ubiquitäre Transkriptionsfaktor wird mittlerweile mit einer Reihe maligner Erkrankungen assoziiert. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Inhibierung von PI3K mit dem spezifischen Inhibitor LY294002 in AML Patienten zu einer Rekonstitution der p53 Aktivität führen kann [56]. Sehr häufig stehen Mutationen in den Genen für PI3K und Akt im Zusammenhang mit Krebserkrankungen. Eine konstitutive Akt1 Aktivierung resultiert aus einer Mutation in seiner PH-Domäne [49]. Als indirekter Regulator des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges spielt Ras eine wichtige Rolle. Für dieses Proto-Onkogen wurden in ca. 30% aller Tumore Punktmutationen identifiziert, die zu einer konstitutiven Ras-Aktivität und somit zur unkontrollierten Proliferation von Zellen führen [42].

Bei der primären AML kann der mTORC2 Komplex aktiviert sein und trägt über die Phosphorylierung von Akt an Ser473 zu einer Aktivierung des Signalweges bei [49]. In einer kleinen Studie konnte gezeigt werden, dass die Ser473 Phosphorylierung von Akt in 3 von 5 Patienten nach Temsirolimus Behandlung und in 6 von 8 Patienten nach Everolimus Behandlung reduziert ist [57].

Die Mechanismen der Aktivierung des mTORC1 Komplexes in Krebserkrankungen sind

nicht ganz geklärt. So zeigten in einer Untersuchung ca. 50% der AML eine mTORC1 Aktivierung, jedoch keine PI3K/Akt Aktivierung [58]. Die Src-Kinase Lyn reguliert mTORC1. In einigen leukämischen Zellen ist diese phosphoryliert und aktiviert mTORC1 [59]. Der genaue Einfluss vom mTOR auf hämatopoetische Erkrankungen ist jedoch nicht geklärt.

mTOR spielt bei der Entstehung solider Tumore eine Rolle. Im Nierenzellkarzinom (RCC) hat mTOR einen Einfluss auf Angiogenese Signalwege, welche häufig aktiviert sind. Mutationen und Expressionsverlust des Hippel-Lindau Gens (*vhl*) treten häufig im RCC auf. Ein Verlust von VHL resultiert in einer Akkumulation von HIF-1 α . mTOR reguliert ebenfalls die Synthese von HIF-1 α . Wenn ein Verlust der VHL Funktion sich mit einer Überexpression von mTOR überschneidet, werden Angiogenesefaktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und PDGF β (*platelet derived growth factor* β) überexprimiert [60].

mTOR hat einen Einfluss auf den Zellzyklusablauf durch die Regulation der Cap-abhängigen Translation. Dadurch werden c-Myc und Cyclin D1 als Zellzyklusregulatoren gesteuert [42]. Cyclin D1 ist ein Protein, das für die Aktivierung der cyclinabhängigen Kinasen 4 und 6 verantwortlich ist. Diese Enzyme sorgen dafür, dass die Zellen den kritischen G₁/S-Restriktionspunkt des Zellzyklus passieren.

1.5.3. mTOR-Inhibitoren

Rapamycin ist ein Makrolid-Antibiotikum und wurde 1965 entdeckt, als man Bodenproben der Osterinseln (Rapa Nui) untersuchte. Es wurde aus Streptomyceten *Streptomyces hygroscopicus* isoliert. In Mäusen wurden dem Antibiotikum erstmals 1977 immunsuppressive Eigenschaften nachgewiesen [61]. Rapamycin arretiert T-Zellen, durch eine Blockade vieler Signaltransduktionswege, in der G₁-Phase des Zellzyklus [62]. In tierischen Zellen bindet Rapamycin mit nanomolarer Affinität an das *FK506-binding protein* FKBP12 und kann so als *Drug-Rezeptor* Komplex mit mTOR interagieren [63]. Dies führt zur Dephosphorylierung und Inaktivierung der p70S6K. Ebenfalls resultiert eine Inhibierung von mTOR durch Rapamycin in einer Dephosphorylierung von 4E-BP1. Durch diese Mechanismen blockiert Rapamycin die Proteinbiosynthese und induziert einen Zellzyklus-Stop in der G₁-Phase. Das letztere Phänomen wird auch auf die Regulierung der Bildung von Cyclin D1 durch mTOR zurückgeführt [47]. Die genaue Funktionsweise von Rapamycin ist bis heute nicht ganz geklärt. Es wird vermutet, dass der FKBP12/Rapamycin Komplex die Dissoziation von Raptor und mTOR begünstigt [64]. Daher beeinflusst Rapamycin nur die Funktion von mTORC1.

Neben Rapamycin gibt es mittlerweile weitere „Rapaloge“ wie Temsirolimus oder Everolimus (RAD001), die sich durch eine verbesserte Stabilität auszeichnen. Zur Behandlung der AML sind diese Rapaloge jedoch wenig effektiv und induzieren nur geringe Raten an Apoptose. Diese Ineffizienz von Rapalogen kann durch die Induktion der PI3K Aktivität nach mTORC1 Inhibierung erklärt werden. Der negative *Feedback*-Mechanismus von mTORC1, bzw. p70S6K zu IRS1 resultiert in einer Aktivierung von PI3K und somit in einer erhöhten Akt Phosphorylierung an Ser473 (vgl. Abb. 1.6, S. 20) [49]. Aus diesem Grund wurde ein dualer PI3K- und mTOR-Inhibitor, PI-103, entwickelt. Dieser induziert in Blastzellen und unreifen leukämischen Zellen Apoptose [65].

Die zweite Generation von mTOR-Inhibitoren, sogenannte TORKinhibs, wirken gezielter als die Rapaloge. Durch Bindung an die katalytische Domäne von mTOR konkurrieren diese mit ATP und inhibieren die Kinaseaktivität von mTOR. Dadurch kann man mTORC1 und mTORC2 inhibieren und so den *Feedback*-Mechanismus kontrollieren. Torin1 und PP242 gehören zu diesen TORKinhibs [48].

1.6. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung differenziell exprimierter miRNAs

- bei der akuten myeloischen Leukämie im Vergleich zu normalen Vorläuferzellen.
- bei zytogenetisch definierten Subgruppen der akuten myeloischen Leukämie und CD34+ Zellen von Normalspendern.

In einer bioinformatischen Analyse sollen dann

- die Zielgene der miRNAs mittels verschiedener Programme bestimmt werden.
- die gefundenen Zielgene intrazellulären Signalwegen zugeordnet werden.

Im letzten Teil der Arbeit sollen die gefundenen potenziellen Zielgene mittels Western Blot Analysen und Reporter Assays validiert werden. Weiterhin soll der Einfluss der miRNA auf die Signalwege näher analysiert werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Antibiotika

Bezeichnung	Qualität	Hersteller
Ampicillin Natriumsalz	≥99%, für die Molekularbiologie und Biochemie	ROTH
Ciprofloxacin	≥98%	Sigma
Penicillin / Streptomycin, 100 ×	10000 U / ml Penicillin, 10000 µg / ml Streptomycin	Gibco

2.1.2. Antikörper

Antikörper	Hersteller
Akt2 (D6G4)	Cell Signaling
α-Tubulin (DM1A)	Cell Signaling
β-Actin (13E5)	Cell Signaling
donkey anti-goat IgG-HRP	SantaCruz
donkey anti-mouse IgG-HRP	SantaCruz
donkey anti-rabbit IgG-HRP	SantaCruz
FRAP (N-19)	SantaCruz
hSNF2h (H-300)	SantaCruz
PI3-Kinase p85α	BD Transduction Laboratories
PI3-Kinase p110δ	Abcam
Raptor (24C12)	Cell Signaling
Rictor (53A2)	Cell Signaling

2.1.3. Bakterien

Stamm	Anbieter
<i>E. coli Top10</i>	Invitrogen
<i>E. coli XL1 Blue</i>	Invitrogen

2.1.4. Chemikalien

Substanz	Qualität	Hersteller
Acrylamid	40%	Biorad
Agarose		Biozym
Ammoniumpersulfat (APS)	≥98%	Gibco-BRL
Borsäure		Merck
Calciumchlorid	≥99%	Merck
Calpain Inhibitor I (ALLN)		Sigma
Chloroform		Merck
Chloroquin		Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	≥99,7%	Merck
Dithiothreitol (DTT)		Invitrogen
Ethanol, absolut	≥99,8%, p. a.	J.T. Baker
Ethidiumbromidlösung (3,8-Diamino-5-Ethyl-6-Phenylphenanthridinium-Bromid)	1%-Lösung	Sigma
Ethylendiamintetraacetat, Natriumsalz (EDTA)	analytical grade	SERVA
Glukose		BD
Glycerin	≥99,5%	Merck
Glycin	≥99,7%	Merck
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	≥99,9%	Sigma
Hefe-Extrakt		BD
Isopropanol	≥99,8%, p. a.	J.T.Baker
Kaliumchlorid		Merck
Magermilchpulver	für die Mikrobiologie	Merck
Magnesiumchlorid		Merck
Magnesiumsulfat		Merck
Methanol	≥99,9%, p. a.	J.T.Baker
MG-132		Merck
Natriumacetat		Sigma
Natriumbutyrat		Merck
Natriumchlorid		Sigma
Natriumdeoxycholat		Sigma

Substanz	Qualität	Hersteller
Natriumdodecylsulfat (SDS ultra pure)	10%	Gibco
Natriumfluorid	≥99,9%	Sigma
Natriumhydrogenphosphat	≥99,5%	Merck
Natriumorthovanadat	≥90%	Sigma
Natronlauge		Merck
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	≥99,0%	Sigma
Poly-L-Lysin		Sigma
Polybrene		Sigma
Propidiumiodid (PI)	≥95,0% (HPLC)	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail Set III		Calbiochem
RAD001		Novartis
Rapamycin	≥95%	Sigma
Salzsäure		Merck
Sephadex G50		Sigma
Tetramethylethyldiamin(TEMED)		Merck
Tetra-Natriumpyrophosphat (TSPP)		Sigma
Trichostatin A		Sigma
Tricine	ULTROL Grade	Calbiochem
tris(Hydroxymethyl)aminomethane (Tris-Base)		Calbiochem
Tris-HCl	pH 7,5	Gibco
Triton X-100		Sigma
Trypanblau 0,4%		Sigma
Trypsin-EDTA	0,5%, 5,3 µM	Gibco
Trypton		BD
Tween 20		Merck
Wasser	HPLC-Qualität	Merck

2.1.5. Desinfektionsmittel

Desinfektionsmittel	Einsatzgebiet	Hersteller
Bacillol	Flächen, Geräte	Bode
Dismozon pur	S1 Flüssigkeitsabfall	Bode
Incidin	Flächen, Geräte	ecolab
Incidin perfect	Flächen, Geräte (nach Arbeiten mit stabilen VSV.G pseudotypisierten Viren)	ecolab
Sterillium	Händedesinfektion	Bode
Sterillium virugard	Händedesinfektion (nach Arbeiten mit stabilen VSV.G pseudotypisierten Viren)	Bode

2.1.6. Enzyme

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Roche
<i>BamHI</i>	New England Biolabs
<i>BglIII</i>	New England Biolabs
DNase I	New England Biolabs
<i>EcoRI</i>	New England Biolabs
Klenow Enzym	New England Biolabs
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen
MultiScribe Reverse Transkriptase	Applied Biosystems
<i>NotI</i>	New England Biolabs
<i>SacII</i>	New England Biolabs
T4 Polynukleotid Kinase	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
<i>XhoI</i>	New England Biolabs

2.1.7. Gebrauchslösungen

Lösung	Hersteller
5×First-Strand Buffer	Invitrogen
10×RT Buffer	Applied Biosystems
ATP, 10mM	New England Biolabs
Bradford Reagenz	Biorad
BSA	New England Biolabs
DNA Ladder	Roche
dNTP Mix, 100mM	Applied Biosystems
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen
NuPage LDS Sample Buffer (4×)	Invitrogen
NuPage Sample Reducing Agent (10×)	Invitrogen
PBS	Gibco
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Invitrogen
Precision Plus Protein Standard	Biorad
RNase Inhibitor	Applied Biosystems
RNase Zap	Ambion
SYBR Green PCR Master Mix, 2×	Applied Biosystems
T4 DNA Ligase Puffer, 10×	New England Biolabs
T4 PNK Puffer, 10×	New England Biolabs
Taqman Universal PCR Master Mix, 2×	Applied Biosystems
TRIzol Reagent	Invitrogen

2.1.8. Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
-80 °C Gefrierschrank	-85 °C Ultralow	NuAire
Autoklav		Getinge
Bioanalyzer	Agilent 2100	Agilent Technologies
Blotmodul	X Cell SureLock	Invitrogen
Brutschrank Bakterien		Omnilab
Brutschrank (mit CO ₂ Begasung)		Heraeus
Durchflusszytometer	FACS Calibur	BD
Eismaschine		Ziegra Eismaschinen
elektrische Pipettierhilfe	Pipetboy acu	Integra Bioscience
Elektrophoresekammer		Biorad
ELISA-Reader	Mithras LB940	Berthold Technologies
Fluoreszenzmikroskop	Eclipse TE 300	Nikon
Gefrierschrank (-20 °C)	Premium	Liebherr
Gel-Dokumentationssystem	G:Box	Syngene
Gelsystem für Proteingele (1 mm)	Mini-PROTEAN	Biorad
Heiz- und Magnetrührer	MR3002	Heidolph
Heizblock		Abimed
Heizblock mit Vortexfunktion	Thermomixer comfort	Eppendorf
Imaging System	VersaDoc 3000	Biorad
Kühlschrank		Liebherr
Mehrkanalpipette (8-Kanal, 5 - 100 µl)	eppendorf research	Eppendorf
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss
N ₂ -Tank		Linde
Netzgerät (Agarosegele)	Consort E815	Consort
Netzgerät (Proteingele)	Power Pac HC	Biorad
Photometer	Gene Quant II	Pharmacia Biotech
Pipette 0,1 - 2,5 µl	eppendorf research	Eppendorf
Pipette 1,0 - 10,0 µl	eppendorf research	Eppendorf
Pipette 10 - 100 µl	eppendorf research	Eppendorf
Pipette 100 - 1000 µl	eppendorf research	Eppendorf
Pipette 20 - 200 µl	eppendorf research	Eppendorf
Real-Time PCR System	7500 Fast / StepOne Plus	Applied Biosystems
Schüttelinkubator	Thermoshake	Gerhardt
Sequenzierer	310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Spektralphotometer	NanoDrop 1000	peqLab
sterile Werkbank	HERA safe	Kendro
Thermocycler	GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems

Gerät	Typ	Hersteller
Tischzentrifuge	Galaxy 140	VWR
Tischzentrifuge, kühlbar	Centrifuge 5415R	Eppendorf
Vortexer	Reax top	Heidolph
Waage		Satorius
Zellzählgerät	AcT	Beckman Coulter
Zentrifuge, kühlbar	GS6KR centrifuge	Beckman
Zentrifuge, kühlbar	Multifuge 1.0R	Heraeus
Zentrifuge, kühlbar	Multifuge 1SR	Heraeus

2.1.9. Komplettsysteme

Kit	Hersteller
Agilent RNA 6000 Nano Reagents	Agilent Technologies
ECL Western Blotting Detektion	Amersham
BigDye Terminator Sequencing Kit	Applied Biosystems
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche
Clean-up of Sequencing Reactions	Macherey-Nagel
Dual-Glo Luciferase Assay System	Promega
peqGOLD HP Plasmid Midiprep Kit	peqLab
peqGOLD HP Plasmid Miniprep Kit	peqLab
peqGOLD XChange Plasmid Maxi Kit	peqLab
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
TaqMan MicroRNA Assay	Applied Biosystems
Venor GeM Mykoplasmen Detektions Kit	Minerva Biolabs

2.1.10. Medien

Medium	Hersteller/Zusammensetzung
DMEM	Gibco
FCS	Gibco
LB Agar	Invitrogen
LB Broth Base	Invitrogen
RPMI-1640	Gibco
SOB	2% Trypton(w/v), 0,5% Hefe-Extrakt (w/v), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ pH 7
SOC	SOB-Medium, 20 mM Glukose
TP	10 mM HEPES, 15 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O, 250 mM KCl, 55 mM MnCl ₂ x 4 H ₂ O, pH 6,7 mit KOH einstellen

2.1.11. Oligonukleotide

Oligo	Sequenz
miR-100 <i>sense</i>	5'AATTCCCTGTTGCCACAAACCCGTAGATCCGAACCTTGTGGTA TTAGTCCGCACAAGCTTGTATCTATAGGTATGTGTCTGTTAGG G 3'
miR-100 <i>antisense</i>	5'GATCCCCTAACAGACACATACCTATAGATACAAGCTTGTGCG GACTAATACCACAAGTTCGGATCTACGGGTTTGTGGCAACAGG G 3'
mTOR <i>sense</i>	5'TCGAGATTTTGGGGAACAGAAGATCCATAACTTTA GAAATACGGGTTTGTACTTAACTCACAAGAGAGC 3'
mTOR <i>antisense</i>	5'GGCCGCTCTCTTGTGAGTTAAGTCAAACCCGTAT TTCTAAAGTTATGGATCTTCTGTTGCCCAAATC 3'
Raptor <i>sense</i>	5' TCGAGTTCCTCACATACAGGCAAGAGGCACTGCCG GGTCCCGGACGGCTCCGGGTGACACCAGCCCCGC 3'
Raptor <i>antisense</i>	5' GGCCGCGGGGCTGGTGTCACCCGGAGCCGTCCGGG ACCCGGCAGTGCCCTTGCCTGTATGTGAGGAAC 3'

2.1.12. Primer für die PCR

Primer	Sequenz
Akt2-F	CAAGCGTGGTGAATACATCAAGA
Akt2-R	GCCTCTCCTTGTACCCAATGA
GapDH-F	GAAGGTGAAGGTCGGAGT
GapDH-R	GAAGATGGTGATGGGATTTC
mTOR-F	TCCGAGAGATGAGTCAAGAGG
mTOR-R	CACCTTCCACTCCTATGAGGC
PI3K p85 α - F	TACTGTAGCCAACAACGGTATGA
PI3K p85 α - R	TCCCGTCTGCTGTATCTCGAA
Random Primer	Gibco BRL
Raptor-F	AGAGGCACTGTGAGAAAATTGAA
Raptor-R	TCAGGCACAAAACCTAAGGCAA

2.1.13. Primer für die Sequenzierung

Primer	Sequenz
HSV-TK3'	CCGCGAGGTCCGAAGACTCAT
hRluc5'	CGTGGAGCGCGTGCTGAAGAAC
Seq H1 dan	CCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGA
SFFV-3'FP	AGCTCACAAACCCTCACTCGG

2.1.14. Software

Anwendung	Software	Herausgeber / Quelle
Bildbearbeitung	Power Point, Paint	Microsoft
Durchflusszytometrie	CXP	Beckman Coulter
Klonierungen	Vector NTI Advance	Invitrogen
miRNA Zielgenanalyse	MicroCosm, PicTar, TargetScan, RNA22	Open Source
miRNA Zielgenanalyse II	Our Target Tool Operator (<i>OTTO</i>)	P. Heinzelmann
Signalweganalyse	GenMAPP2/ MAPPFinder	Open Source
Primererstellung	PrimerExpress	Applied Biosystems
Real-Time PCR Analyse	StepOne Plus Software	Applied Biosystems
Sequenzierungen	310 Genetic Analyzer Software	Applied Biosystems
Sequenzanalyse (Alignments)	ClustalW	Online-Tool, EMBL-EBI
Statistik	R, Bioconductor	Open Source
Tabellenkalkulation	Excel	Microsoft
Textsatz	L ^A T _E X	Open Source
Western Blot Quantifizierung	Quantity One	Biorad

2.1.15. Vektoren/Plasmide

Vektor	Hersteller
pSUPER- Δ E Δ B-miR30	Scherr et al. [66]
pCMV Δ R8.91	Didier Trono, Lausanne
pMD.G	Daniel Ory, Washington University
pSUPER	Thijn Brummelkamp, Whitehead Institute Cambridge
psiCHECK-2	Invitrogen
pUC19	Invitrogen
SIEW	nach SEW von Adrian Thrasher, London

2.1.16. Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
0,2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
12-Well Platten, F-Boden	Sarstedt
1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt
15 ml Röhrchen	BD Falcon
175 cm ² Flaschen mit Filterdeckel	Greiner Bio-One

Artikel	Hersteller
2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
20 ml Plastikspritzen	Sarstedt
24-Well Platten, F-Boden	Greiner Bio-One
25 cm ² Flaschen mit Filterdeckel	Greiner Bio-One
3MM Filterpapier	Whatman
48-Well Platten, F-Boden	Greiner Bio-One
5 ml Plastikröhrchen (FACS-Röhrchen)	BD Falcon
50 ml Plastikspritzen	Sarstedt
50 ml Röhrchen	BD Falcon
6-Well Platte, F-Boden	Sarstedt
75 cm ² Flaschen mit Filterdeckel	Greiner Bio-One
96-Well Platten, F-Boden	Greiner Bio-One
Alufolie	ROTH
Einwegpipetten	Sarstedt
Eisbehälter	ROTH
Erlenmeyerkolben	Brand
Kyroröhrchen	Schmidt Laborgeräte
Messkolben	Brand
Messzylinder	Brand
MicroAmp 96-Well Platte	Applied Biosystems
MicroAmp Optischer Film	Applied Biosystems
Nitrocellulosemembran	Whatman
Pasteurpipetten	Brand
Petrischale (Bakterienkultivierung)	Sarstedt
Pipettenspitzen mit Filter	Brand
Pipettenspitzen	Sarstedt
Plastikgalkassetten	Invitrogen
Sterilfilter 0,45 µm	BD Falcon

2.1.17. Zelllinien

Zelllinie	Quelle
293	DSMZ, ACC305 [67]
32D-ctrl	Z. Li, Experimentelle Hämatologie, MHH [68]
32D Δ trkA	Z. Li, Experimentelle Hämatologie, MHH [68]
HuH-7	JCRB, 0403 [69]
K562	DSMZ, ACC10 [70]
Kasumi-1	DSMZ, ACC220 [71]
U937	DSMZ, ACC5 [72]
WEHI-3B	DSMZ, ACC26 [73]

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. miChip Mikroarray

2.2.1.1. Prinzip

Zur Analyse von miRNAs verwendet man Northern Blot, *Bead*-basierte Profilierungsmethoden oder die miR-qRT-PCR. Eine weitere Möglichkeit ist die Analyse mit der miChip Mikroarray Methode. Hierbei druckt man mehrere tausend Oligonukleotide auf eine Glasfolie und kann dadurch Analysen im Hochdurchsatzverfahren durchführen. Die RNA Proben werden mit fluoreszierenden Farbstoffen (Cy-Dyes) markiert und dann an komplementäre Zielsequenzen auf der Mikroarray Folie hybridisiert. Nachdem ungebundene RNA durch Waschen entfernt wurde, kann man das Fluoreszenzsignal an jeder einzelnen Position bestimmen. Die Intensität der Fluoreszenz gibt Aufschluss über die Menge einer bestimmten RNA in der zu untersuchenden Probe.

Aufgrund ihrer kleinen Größe, Sequenzähnlichkeiten und verschiedener Schmelztemperaturen ist die Analyse von miRNAs mit solch einem System problematisch. Um diese Probleme zu umgehen, werden *locked nucleic acids* (LNA) verwendet. In den LNAs ist das C2- mit dem C4-Atom des Riboseringes durch eine Sauerstoff-Methylen-Gruppe in 3'-Endokonformation fixiert. Durch das Einbringen von LNAs in Oligonukleotide erzielt man eine erhöhte thermische Stabilität in den Nukleinsäure-Duplexen. Für miRNAs reichen die Schmelztemperaturen von 42 °C bis 75 °C. Diese kann durch LNAs auf 72 °C normalisiert werden. Dadurch sind gleiche Hybridisierungsbedingungen und ein verbesserter *Mismatch*-Ausschluss, aufgrund einer erhöhten Schmelztemperatur, gewährleistet [74] [75].

2.2.1.2. Durchführung

Die miChip Mikroarray Analyse wurde am EMBL, Heidelberg durchgeführt (basierend auf miRBase v 6.0 und miRBase v 8.0). Die miChip Daten wurden mittels der Software R und Bioconductor analysiert. Dazu wurden die Fluoreszenzsignale global über die Expression aller mi/snRNAs normalisiert.

2.2.2. Reverse Transkription

2.2.2.1. Prinzip

Das Prinzip der reversen Transkription (RT) beruht auf dem Reproduktionsmechanismus der Retroviren. *Retro* ist das lateinische Wort für „zurück“ und bezieht sich auf die umgekehrte Richtung des genetischen Informationsflusses bei diesen Viren. Durch das Enzym Reverse Transkriptase ist es ihnen möglich RNA in cDNA umzuschreiben. Die neu gebildete DNA integriert dann als Provirus in die Chromosomen tierischer Zellen und kann weiter transkribiert werden [76]. Für die reverse Transkription werden das Enzym Reverse Transkriptase, Primer, dNTP und RNase Inhibitor benötigt. Die resultierende cDNA kann nach der Reaktion durch weitere PCR Verfahren analysiert werden. Für die RT Reaktion können verschiedene Arten von Primern benutzt werden: Oligo (dT) Primer, Random (Hexamer) Primer oder genspezifische Primer. Diese werden zum Beispiel für die miR-qRT-PCR verwendet.

2.2.2.2. Durchführung

Um Kontaminationen genomischer DNA in der RT-Reaktion zu vermeiden, wurde total RNA mit DNase I behandelt. Die DNase I spaltet die genomische DNA enzymatisch zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxygruppe zweier Nukleotide. Der folgende Ansatz wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert.

Ansatz für DNase I Verdau	
Substanz	1 ×
5 × First-Strand Buffer.....	4 µl
0,1 M DTT.....	0,8 µl
DNase I (10 U/µl).....	3 µl
RNase Inhibitor	0,5 µl
5 µg RNA	11,7 µl
Volumen	20 µl

Zur Aufreinigung der RNA wurde eine Phenol/ Chloroform - Fällung durchgeführt. Dazu wurden 30 µl Wasser und 50 µl Phenol/ Chloroform zum Ansatz gegeben, gemischt und zur Separierung der Phasen kurz zentrifugiert. 50 µl des Überstandes wurden dann zur Fällung für 60 min bei -80 °C in 1 µl Glykogen und 150 µl Ethanol (96%) gegeben. Anschließend wurde die RNA durch Zentrifugation pelletiert und in 10 µl Wasser aufgenommen.

Im nächsten Schritt wurde die RNA für 10 min bei 70 °C zur Denaturierung erhitzt und anschließend schnell auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe eines Master Mixes aus Puffer, DTT, dNTP, Primer und Reverse Transkriptase erfolgte die reverse Transkription bei 37 °C für 60 min.

Ansatz für die reverse Transkription	
Substanz	1 ×
5 × First-Strand Buffer.....	4 µl
0,1 M DTT.....	2 µl
10 mM dNTP.....	2 µl
Random Primer (100 pmol/µl).....	1 µl
M-MLV RT (200 U/µl).....	1 µl
1 µg RNA.....	11 µl
Volumen.....	21 µl

2.2.3. Real-Time PCR

2.2.3.1. Prinzip

Die Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist im Prinzip eine exponentielle Vervielfältigung von DNA. Diese Methode nutzt die Eigenschaften der DNA-Polymerasen an freie 3'OH-Enden der ssDNA zu binden und neue DNA Stränge zu synthetisieren. Um diesen Prozess zu initiieren benötigt die Polymerase jedoch ein kleines Stück dsDNA, das durch Anlagerung von Primern geschaffen wird. Durch die Notwendigkeit eines Denaturierungsschrittes, verwendet man thermostabile Polymerase, wie die Taq-Polymerase. Im ersten Schritt der PCR wird die dsDNA denaturiert, um die beiden komplementären Stränge zu trennen. Es folgt eine Erniedrigung der Temperatur, so dass sich die Primer an die ssDNA anlagern können (*annealing*). In diesem Schritt wird der Startpunkt für die DNA-Polymerase festgesetzt. Im letzten Schritt der PCR füllt die DNA-Polymerase den fehlenden Strang mit Nukleotiden auf. Diese drei Schritte werden wiederholt. Daher erhält man n Zyklen ein theoretisches Maximum von 2^n dsDNA Molekülen [77].

Die Grundlage für die *real-time* PCR (Echtzeit-PCR) war die Beobachtung, dass die Amplifikation zu Beginn der PCR linear verläuft. Durch einen sensitiven Nachweis der Produktmenge ergibt sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen eingesetzter DNA Menge und dem PCR-Zyklus in dem zum ersten Mal ein Produkt nachgewiesen werden kann.

Als Nachweisreagenzien haben sich zwei Systeme bewährt. Neben dem Einsatz spezifischer Taqman-Sonden (vgl. Kapitel 2.2.4, S. 40) hat sich ein DNA interkalierender Fluoreszenzfarbstoff (SYBR-Green) für die *real-time* PCR bewährt. Während der Amplifikation der DNA wird dieser Farbstoff in die dsDNA eingebaut. An dsDNA gebundenes SYBR Green fluoresziert um Zehnerpotenzen intensiver als ungebundenes. Daher ist ein Anstieg der SYBR-Green Fluoreszenz ein direktes Maß für die vorhandene dsDNA im Ansatz. Ein Problem dieser Methode ist jedoch, dass der Farbstoff nicht spezifisch in PCR Produkte, sondern auch in Primerdimere eingebaut wird. Es ist daher notwendig, am Ende der PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen. Größere PCR Produkte schmelzen bei höheren Temperaturen als kleiner Primerdimere und zeigen deshalb einen Fluoreszenzabfall bei höheren Temperaturen.

2.2.3.2. Durchführung

Die PCR Reaktionen wurden in Triplikaten durchgeführt. Als interne Kontrolle wurde eine Probe ohne DNA analysiert, sowie eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Ansatz für die SYBR-Green PCR		
Substanz	1 ×	3,2 ×
2 × SYBR-Green Master Mix	10 µl	32 µl
Forward/ Reverse Primer (2 µM)	1 µl	3,2 µl
cDNA aus RT-Reaktion	9 µl	28,8 µl
Aliquotvolumen	20 µl	64 µl

Protokoll für die PCR mit SYBR-Green					
Schritt	Temperatur	Dauer	Schritt	Temperatur	Dauer
1	50 °C	2 min	Schmelzkurve		
2	95 °C	10 min	5	95 °C	15 sec
3	95 °C	15 sec	6	60 °C	1 min
4	60 °C	1 min	7	95 °C	15 sec
3-4		40×			

2.2.4. miR-qRT-PCR

2.2.4.1. Prinzip

Aufgrund ihrer geringen Größe von ca. 20-25 Nukleotiden ist die Analyse von miRNAs mit Standard-PCR Techniken nicht möglich. MiRNA und Primer haben etwa die gleiche Größe. Dies macht eine Amplifikation unmöglich. Um miRNAs dennoch mittels PCR zu

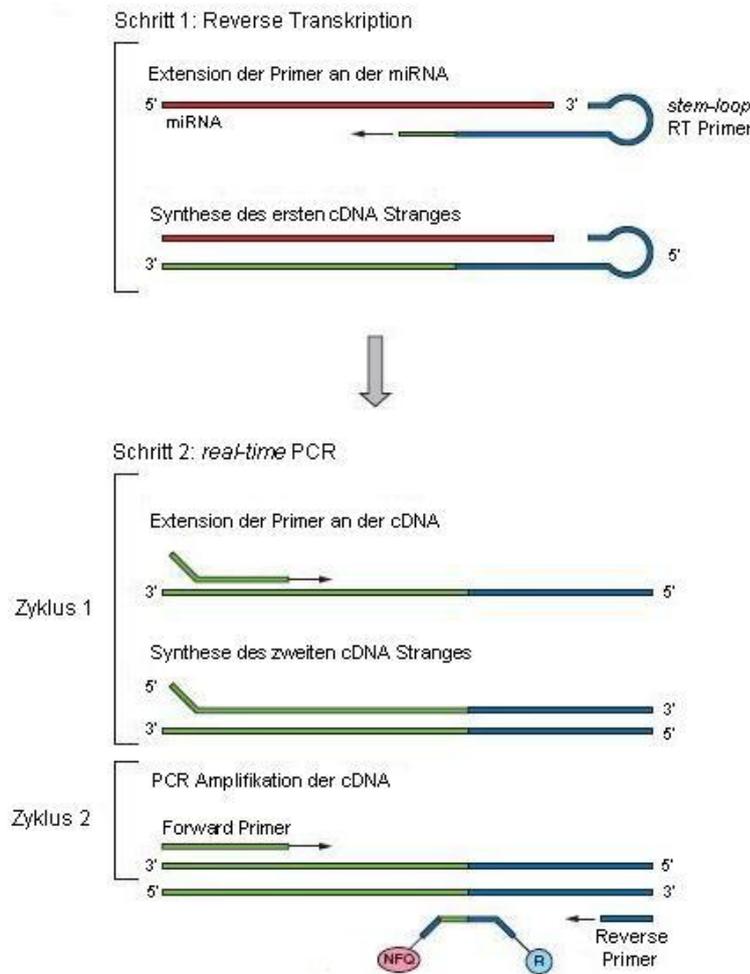


Abbildung 2.1.: Prinzip der miR-qRT-PCR. Im ersten Schritt bindet ein *stem-loop* Primer sequenzspezifisch an die miRNA. Während der *real-time* PCR erhöht eine sequenzspezifische Taqman-Sonde die Genauigkeit der Reaktion. R: Reporter, NFQ: nicht fluoreszierender *Quencher*, nach [78].

analysieren, wurde die miRNA-quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion entwickelt, kurz miR-qRT-PCR. Diese Methode beruht auf einer genspezifischen

RT-Reaktion mit anschließender *real-time* PCR. Ein wesentlicher Vorteil der miR-qRT-PCR gegenüber der herkömmlichen PCR besteht in dem Gebrauch von sogenannten *stem-loop* Primern. Diese binden schon während der reversen Transkription spezifisch an die miRNA und ermöglichen ein exaktes umschreiben in cDNA (vgl. Abb. 2.1, S. 40). Im nächsten Schritt binden die PCR Primer spezifisch an die *stem-loop* und miRNA Sequenz. Der *stem-loop* enthaltende Strang wird nun exponentiell amplifiziert. Der Einsatz von genspezifischen Taqman-Sonden macht eine exakte Detektion mittels Echtzeit Analyse möglich.

Die Funktion verschiedener Taqman-Sonden beruht auf dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET), das von T. Förster entdeckt wurde. Hierbei wird die Energie eines angeregten Farbstoffes (Reporter) strahlungsfrei auf einen zweiten Farbstoff (*Quencher*) übertragen. Durch die Nähe von einem Reporter und einem *Quencher* Farbstoff in der Taqman-Sonde wird ein Fluoreszenzsignal unterdrückt. Die Sonde bindet spezifisch an ihre komplementäre Sequenz abwärts der Primer. Die DNA-Polymerase degradiert die Sonde während der Synthese mit ihrer Exonukleaseaktivität. Dadurch entfernt sich der *Quencher* vom Reporter und ein Anstieg der Fluoreszenz kann gemessen werden [79].

2.2.4.2. Durchführung

Zur Bestimmung der miRNA Expression wurden miRNA-spezifische TaqMan MicroRNA Assays verwendet. Die Methode wurde laut Protokoll durchgeführt. Für die miRNA-spezifische reverse Transkription wurden 12 µl eines Master Mixes zu 3 µl 5×TaqMan MicroRNA RT Primer gegeben.

Ansatz für reverse Transkription	
Substanz	1 ×
100 mM dNTP	0,15 µl
MultiScribe RT	1 µl
10 ×RT Puffer	1,5 µl
RNAse Inhibitor	0,2 µl
22 µg RNA	10 µl
Volumen	12,85 µl
5 ×TaqMan MicroRNA RT Primer	3 µl
Endvolumen	15 µl

Protokoll für die reverse Transkription		
Schritt	Temperatur	Dauer
1	16 °C	30 min
2	42 °C	30 min
3	85 °C	5 min
4	10 °C	∞

Die *real-time* PCR Reaktion wurde in Duplikaten durchgeführt. Hierfür wurden spezifische Primer und TaqMan Universal PCR Master Mix der Firma Applied Biosystems verwendet. 3,3 µl der cDNA wurden zu 40,7 µl Master Mix gegeben und zu je 20 µl in eine 96-Well Platte gegeben. Die PCR wurde mit dem 7500 Fast Real-Time PCR System oder dem StepOnePlus durchgeführt.

Ansatz für die Taqman PCR	
Substanz	2,2 ×
2 × Taqman Universal PCR Master Mix..	21,5 µl
20 × miRNA PCR Primer.....	2,1 µl
Wasser	17,1 µl
cDNA aus RT-Reaktion	3,3 µl

Protokoll für die PCR		
Schritt	Temperatur	Dauer
1	50 °C	2 min
2	95 °C	10 min
3	95 °C	15 sec
4	60 °C	1 min
3-4		40×

Eine Normalisierung wurde mittels 2- $\Delta\Delta$ Ct-Methode relativ zur miR-197 oder miR-15b durchgeführt [80]. Diese miRNAs waren nahezu identisch in den verschiedenen AML Patienten und Normalspendern, sowie unter verschiedenen Konditionen in allen verwendeten Zelllinien exprimiert. Für die murinen Zelllinien wurde snoRNA202 als Normalisierungskontrolle verwendet.

2.2.5. Kinasierung von Oligonukleotiden

2.2.5.1. Prinzip

Synthetisch hergestellte Oligonukleotide benötigen für die Ligation in einen Vektor phosphorylierte 5'-Enden. Dazu nutzt man das Enzym T4 Polynukleotidkinase (PNK). Die PNK überträgt Phosphatgruppen von der γ -Position der ATP-Moleküle auf die 5'-Hydroxygruppe von Polynukleotiden, z.B. einzel- oder doppelsträngiger DNA/ RNA. Weiterhin enthält die PNK 3'-Phosphatase Aktivität. Die anschließende Hybridisierung einzelsträngiger Oligonukleotide zu Duplexen erfolgt durch Aufkochen bei 100 °C und langsamen Abkühlens. Bei Erreichen der spezifischen Schmelztemperatur hybridisieren die Oligonukleotide. Diese können dann direkt für weitere Anwendungen, z. B. Ligationen eingesetzt werden [77].

2.2.5.2. Durchführung

Jeweils 0,1 OD des *sense* und *antisense* Oligonukleotids wurden mit 2 μ l T4 Polynukleotidkinase (PNK, 10 U/ μ l), 2 μ l 10 mM ATP und 2 μ l PNK-Puffer gemischt und auf 20 μ l mit Wasser aufgefüllt. Dann wurde der Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 3 min bei 100 °C im Wasserbad inkubiert und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

2.2.6. Verdau von Plasmid-DNA

2.2.6.1. Prinzip

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die Phosphodiesterbindungen innerhalb von DNA-Strängen abbauen können. Sie stammen aus Bakterien und dienen dem Schutz vor artfremder DNA. Die Restriktionsenzyme erkennen Fremd-DNA, da diese nicht wie die eigene DNA durch Methylierungsmuster geschützt ist. Sie spalten die DNA symmetrisch, wobei glatte Enden (*blunt ends*) oder Enden mit Überhängen (*5'-/3'-sticky ends*) entstehen können. Die Restriktionsenzyme erkennen oft palindrome Sequenzen [77].

Um eine Re-Ligation von verdauter Plasmid-DNA zu vermeiden, werden die Phosphatgruppen an den 5'-Enden entfernt. Dadurch kann das Plasmid nur mit entsprechend kina-

sierten Oligonukleotiden ligiert werden. Als Enzym kommt für diese Anwendung die Alkalische Phosphatase zum Einsatz.

Um nach einem *sticky end*-Verdau *blunt ends* zu erzeugen verwendet man das Klenow-Fragment. Klenow gehört zur Klasse der DNA-Polymerasen I. Es besitzt 3'→5' Exonuklease und 5'→3' Polymerase Aktivität. Eine 5'→3' Exonuklease Aktivität fehlt dem Klenow-Fragment. Dadurch füllt es 5'-überhängende Enden auf und entfernt 3'-überhängende Enden.

2.2.6.2. Durchführung

Für einen analytischen Plasmidverdau wurde 0,5-1 µg Vektor-DNA in einem Endvolumen von 20 µl verdaut. Für einen präparativen Verdau wurden 10 µg Plasmid-DNA in einem Endvolumen von 40 µl verdaut. Es wurden 100 U Restriktionsenzym und 10×Enzym-Puffer zugesetzt. Einige Restriktionsenzyme benötigen BSA, welches in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt wurde. Der Verdau erfolgte für 1-3 h bei 37 °C. Für eine anschließende Klenow Behandlung, wurden die Restriktionsenzyme entweder für 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert oder durch Phenol/Chloroform-Extraktion inaktiviert.

Für den Klenow-Verdau wurden 4 µl MgCl₂, 2 µl 100 mM dNTP, 1 µl Klenow-Fragment und 3 µl Wasser dem Restriktionsverdau zugesetzt und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Klenow-Fragment für 20 min bei 75 °C hitzeinaktiviert.

Zur Dephosphorylierung von verdauter Plasmid-DNA wurde 1 µl Alkalische Phosphatase nach dem Restriktionsverdau dem Ansatz zugesetzt und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert.

2.2.7. Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten über Agarosegelelektrophorese

2.2.7.1. Prinzip

Agarose ist ein Heteropolysaccachrid, das aus roten Meeresalgen gewonnen wird. Durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Seitenketten der Agarose geliert diese beim Erkalten nach Aufkochen. Diese Ausbildung einer stabilen Matrix macht man sich für die Gelelektrophorese zu nutzen. DNA-Moleküle wandern in einem

elektrischen Feld je nach Größe und Ladung unterschiedlich schnell durch Agarosegele. Große Moleküle wandern aufgrund ihres Reibungswiderstandes langsamer als kleine DNA-Moleküle.

Bei der Agarosegelelektrophorese wandert die negativ geladene DNA in einer Gelmatrix zur Anode. Die Größe und die Form der DNA (zirkulär oder linear) haben einen Einfluß auf das Verhalten der DNA in der Gelmatrix, so dass unterschiedliche Fragmente unterschiedlich schnell durch das Gel wandern mit dem Resultat einer Auftrennung. Um die DNA im Gel sichtbar zu machen, mischt man diesem Ethidiumbromid bei. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen der DNA wodurch sich das Anregungsspektrum dieser Substanz verändert und die Fluoreszenz mit ultraviolettem Licht stark erhöht wird. Auf diese Weise leuchten im Agarosegel die Stellen, an denen sich Nukleinsäuren befinden, bei einer Wellenlänge von 320 nm hell auf [81].

2.2.7.2. Durchführung

Je nach Fragmentgröße wurden 1 bis 1,5%-ige Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 100 ml TBE (89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8) in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sie vollständig gelöst war. Nach dem Abkühlen (handwarm) wurde das Ethidiumbromid zugegeben und das Gel gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit TBE-Puffer überschichtet und die Proben aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung von 10 V pro 1 cm Gel wurden die DNA Fragmente aufgetrennt. Anschließend wurden die Bandenmuster unter UV-Licht analysiert.

2.2.8. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

2.2.8.1. Prinzip

Das Prinzip des QIAquick Kits basiert auf der Verwendung eines Silicamaterials. An dieses Material bindet die DNA in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen. Waschschritte entfernen Enzyme, Agarose und weitere Verunreinigungen. Die Elution der DNA erfolgt dann in Lösungen niedriger Salzkonzentrationen oder Wasser.

2.2.8.2. Durchführung

Zur DNA-Extraktion aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die anschließende Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers. Zur besseren Reinigung der DNA wurde die Säule im letzten Schritt mit 100 µl Wasser eluiert und nach Zugabe von 10 µl Natriumacetat (pH 5,2) und 275 µl Ethanol (96%) wurde die DNA für 1 h bei -20 °C gefällt. Nach dem Pelletieren der DNA durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 20 min wurde die DNA einmal mit Ethanol (75%) gewaschen, pelletiert und nach kurzem Trocknen in 20 µl Wasser aufgenommen.

2.2.9. Ligation

2.2.9.1. Prinzip

Bei der Ligation werden zwei DNA Segmente mit enzymatischer Hilfe verbunden. Dazu wird das Enzym T4 DNA Ligase verwendet. Es katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen nebeneinander liegenden 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxy-Enden in DNA oder RNA Duplexen. Für diese Reaktion benötigen die Ligasen Energie in Form von ATP [77].

2.2.9.2. Durchführung

Für die Ligationen wurde 1 µl der geschnittener Plasmid-DNA mit 3 µl Oligonukleotid oder zu klonierendem Fragment (*Insert*) ligiert (Plasmid:Fragment Verhältnis = 1:1). Es wurden 1 µl T4 DNA Ligase, 2 µl 10×T4 DNA Ligase Puffer und 13 µl Wasser zugefügt und über Nacht bei 16 °C inkubiert.

2.2.10. Sequenzierung

2.2.10.1. Prinzip

Zur Sequenzierung von DNA gibt es mehrere Methoden. Die am häufigsten verwendete Methode ist jedoch die DNA-Sequenzierung nach Sanger. Hier macht man sich die Eigenschaften von Didesoxynukleotiden (ddNTP's), denen zwei Hydroxylgruppen (am 2'-

und 3'-Ende der Ribose-Einheit) fehlen, zu nutze. Werden ddNTP's während der DNA-Synthese eingebaut, wird diese abgebrochen. Für die DNA-Sequenzierung wird einzelsträngige DNA mit einem markierten Primer, DNA-Polymerase und dNTPs versetzt. Dieser Ansatz wird gevierteilt, wobei jeder zusätzlich eines der vier ddNTP's (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP) enthält. Während einer PCR werden nun die ddNTP's zufällig an verschiedenen Stellen der DNA eingebaut und unterbinden die DNA-Synthese. Dadurch erhält man verschieden lange Fragmente. Die Fragmente der vier einzelnen Ansätze werden dann über eine Gelelektrophorese aufgetrennt. Dadurch kann man jeder Fragmentlänge ein zugehöriges ddNTP zuordnen. Durch Sortieren der Fragmente vom Längsten zum Kürzesten erhält man dann die DNA-Sequenz.

Neuere Methoden nutzen nicht mehr markierte Primer, sondern fluoreszenzmarkierte ddNTP's. Jedes der vier ddNTP's enthält einen anderen Farbstoff. Dadurch benötigt man nicht mehr vier Reaktionen, sondern kann die Sequenzier-PCR in einer Reaktion durchführen.

Nach der PCR Reaktion muss die DNA von überschüssigem Farbstoff befreit werden. Dazu nutzt man die Methode der Gelfiltration mittels Sephadex Säulen. Der 310 Genetic Analyzer analysiert Produkte der Sequenzier-PCR über eine Kapillar-Elektrophorese. Dazu werden die Proben elektrokinetisch injiziert und über sogenannte POP-Polymere analysiert. Daher werden die Proben in HiDi-Formamid, einem deionisiertem Formamid, gelöst.

2.2.10.2. Durchführung

Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde zunächst eine Sequenzier-PCR mit entsprechenden Primern durchgeführt. Dazu wurden 3 µl Plasmid-DNA mit 4 µl 5 × Sequenzierpuffer, 3 µl BigDye, 1 µl des entsprechenden Primers und 9 µl Wasser gemischt. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

Protokoll für die Sequenzier-PCR		
Schritt	Temperatur	Dauer
1	95 °C	1 min
2	95 °C	30 sec
3	60 °C	4 min
2-3		25 ×
4	10 °C	∞

Das PCR Produkt wurde über NucleoSEQ Säulen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt, um Verunreinigungen durch BigDye und Salzen zu entfernen. Anschließend wurde die aufgereinigte DNA mit 10 µl HiDi Formamid versetzt. Es wurde mithilfe des 310 Genetic Analyzer sequenziert.

2.2.11. Klonierung lentiviraler Vektoren für die mikroRNA Überexpression

2.2.11.1. Prinzip

miRNAs können in Vektoren exprimiert werden, wenn sie Polymerase II Promotoren, wie den SFFV-Promotor (*spleen focus forming virus*), an den *upstream* Enden einer pre-miRNA besitzen. Diese können transkribiert und durch *Dicer* in die reife miRNA prozessiert werden. Im Vergleich dazu werden shRNAs oder miRNA Antagonisten durch Polymerase III Promotoren wie dem H1-Promotor exprimiert. Um die Expression einer shRNA oder auch miRNA zu stabilisieren nutzt man Baugerüste. Künstliche miRNAs können in der Umgebung eines natürlich vorkommenden miRNA Primärtranskripts wesentlich effektiver exprimiert werden [82]. Ein häufig genutztes Gerüst ist die miR30 Kasette. Dabei wird die mi/shRNA am 5'- und 3'-Ende mit einer pre-miR30 Region flankiert [66] [83].

Zur Generierung lentiviraler Überstände wird, neben einem Verpackungs- und einem Hüllplasmid, ein Transgenplasmid benötigt (vgl. S. 59). Das Transgenplasmid enthält neben der LTR (*long terminal repeat*) im 5'-Bereich das Verpackungssignal Ψ , welches für das Verpacken des Virusessentiell ist. Der SFFV-Promotor dient zur Verstärkung der Expression der miR30-pre-miRNA Kasette. Eine IRES (*internal ribosomal entry site*) vermittelt die Bindung der mRNA an die Ribosomen und erhöht dadurch die Translation. Zur weiteren Erhöhung der Genexpression wurde das post-transkriptionelle WPRE (*woodchuck hepatitis B post-transcriptional regulatory element*) in das transgene Plasmid eingefügt (vgl. Abb. 1.3, S. 14) [66].

2.2.11.2. Durchführung

Für die Überexpression der miRNA wurden DNA Oligonukleotide, die eine entsprechende pre-miRNA mit 5' *EcoRI*- und 3' *BamHI*-Überhängen enthalten, auf Grundlage der miRBase entworfen und synthetisch hergestellt [23]. Die Oligonukleotide wurden kinasiert

und hybridisiert bevor sie in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des Vektors pSUPER- Δ E Δ B-miR30 kloniert wurden. Die korrekte Insertion wurde durch einen Verdau und die DNA-Sequenz durch DNA-Sequenzierung überprüft. Für die Sequenzier-PCR wurde der Seq H1 dan-Primer verwendet.

Im nächsten Schritt wurde die miR30-pre-miRNA Kasette mit den Enzymen *BglII* und *XhoI* aus dem Vektor entfernt und *blunt end*, nach entsprechender Klenow-Behandlung, in die *BamHI* Schnittstelle des Vektors SIEW kloniert. Die korrekte Insertion wurde durch einen analytischen Verdau, die DNA-Sequenz durch eine Sequenzierung überprüft. Für die Sequenzier-PCR wurde der SFFV-3'FP-Primer verwendet.

2.2.12. Klonierung der Reportergergen Vektoren

2.2.12.1. Prinzip

Das psiCHECK-2 Plasmid wurde entwickelt um Unterschiede in der Expression eines Zielgens, welches an ein Reportergergen fusioniert ist, nach RNAi zu untersuchen. Ein wesentlicher Vorteil des psiCHECK-2 Plasmids ist, dass sich Reportergergen und interne Kontrolle auf einem Plasmid befinden. Als Reportergergen dient die *Renilla* Luziferase, an welche das Zielgen fusioniert wird. Das Zielgen kann direkt in die multiple Klonierungsregion kloniert werden. Die ebenfalls auf dem Plasmid befindliche Firefly Luziferase dient zur Normalisierung der Transfektion.

2.2.12.2. Durchführung

Die 3'UTR Region von mTOR beinhaltet eine potenzielle Bindungsstelle für die miR-100. Es wurden Oligonukleotide entworfen, die die 23 nt lange Zielsequenz sowie die 5'- und 3'- flankierenden Nukleotide (jeweils ca. 20) enthalten. Zusätzlich wurde das 5'-Ende mit einem *XhoI*-Überhang und das 3'-Ende mit einem *NotI*-Überhang versehen. Die 3'UTR von Raptor enthält zwei potenzielle miR-100 Bindungsstellen, die sich überlappen. Diese 38 nt lange Sequenz wurde in 5' und 3' Richtung mit 12 nt flankiert und ebenfalls mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen versehen. Die Oligonukleotide wurden kinasiert und hybridisiert, bevor sie in die analogen Restriktionsschnittstellen des Plasmids psiCHECK-2 kloniert wurden. Die korrekte Insertion und DNA-Sequenz wurde durch einen analytischen DNA-Verdau und DNA-Sequenzierung überprüft. Für die Sequenzier-PCR wurde der hRluc5'-Primer verwendet.

2.2.13. Kultivierung von Bakterien

2.2.13.1. Prinzip

Bakterien sind die gebräuchlichsten Mikroorganismen in der Gentechnologie, denn sie können in großer Zahl herangezogen und zur Vervielfältigung von DNA genutzt werden. Ein unkompliziertes Einbringen und die Isolierung von DNA aus Bakterien macht eine effiziente Klonierung von Fremd-DNA möglich. Es gibt diverse Laborstämme, von denen sich viele von *Escherichia coli* (*E. coli*) ableiten und durch einen definierten Genotyp auszeichnen. Pathogene Eigenschaften wurden entfernt und z. B. Antibiotikaresistenzen hinzugefügt, um eine Selektion zu ermöglichen.

2.2.13.2. Durchführung

Für die Anzucht von Bakterien wurden nur autoklavierte Lösungen, Gefäße und Verbrauchsmaterialien verwendet. Benötigte Antibiotika wurden zum erkalteten Medium gegeben. Vor dem Ausplattieren auf LB-Agar Platten wurden die Impfösen gründlich abgeflammt. Einzelklone wurde mithilfe einer Pipettenspitze von der Agarplatte isoliert und in größeren Volumen flüssigen LB-Mediums zur DNA-Isolierung mittels DNA Mini/Maxipräparation herangezogen.

Alle Zellen wurden vor dem Entsorgen durch Autoklavieren bei 121 °C für 30 min abgetötet. Geräte wurden ebenfalls durch Autoklavieren sterilisiert.

2.2.14. Herstellung kompetenter Zellen

2.2.14.1. Prinzip

Als kompetent wird eine Zelle bezeichnet, die in der Lage ist ein DNA-Molekül aufzunehmen und dadurch transformiert zu werden. Im Gegensatz zu *Bacillus subtilis* besitzt *E. coli* keine natürliche Kompetenz. Mithilfe einer Calciumchlorid-Behandlung und anschließendem Hitzeschock kann jedoch eine künstliche Kompetenz erreicht werden. Die zugrunde liegenden Mechanismen hierfür sind nicht bekannt. Da die Kompetenz wieder verloren gehen kann, sollten die Zellen bei -80 °C gelagert und bis zur Verwendung nicht wieder aufgetaut werden [84].

2.2.14.2. Durchführung

Mit einer Kolonie XL-1 Blue wurden 10 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C, 200 rpm geschüttelt. 2 ml der Übernachtskultur wurden dann in 250 ml SOB mit 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂ überführt und bei 37 °C, 200 rpm inkubiert bis eine OD_{590nm} = 0,4 bis 0,6 erreicht war. Von nun an wurde im Kühlraum mit vorgekühlten Geräten und Gefäßen gearbeitet. Nach dem pellettieren der Zellen bei 1000 rpm, 4 °C, 10 min wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem TP resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut pelletiert und anschließend in 15 ml TP-7% DMSO resuspendiert. Zu Schluss wurden je 100 µl der Zellsuspension in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettieren und die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach erfolgte die Lagerung bei -80 °C.

Zur Bestimmung der Transformationskompetenz wurden die Bakterien mit 10 und 50 pg pUC19 Testplasmid transformiert. Der Ansatz wurde auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 16 h wurden die Kolonien ausgezählt und die Transformationskompetenz berechnet. Die Transformationskompetenz ist die Anzahl der Kolonien je µg Plasmid-DNA. Es sollten Werte von 10⁷ bis 10⁸ angestrebt werden.

2.2.15. Transformation

2.2.15.1. Prinzip

Bei der Transformation von Bakterienzellen nehmen diese fremde DNA aus dem umgebenden Medium auf. Diese Aufnahme wird durch einen kurzen Hitzeschock gefördert. Eine erfolgreiche Transformation lässt sich durch Ausplattieren auf entsprechenden Selektionsplatten überprüfen. Nur Bakterienzellen, die das Fremd-Plasmid enthalten können auf diesen wachsen.

2.2.15.2. Durchführung

50 µl kompetente Bakterien wurden auf Eis für ca. 5 min aufgetaut und die entsprechende Plasmid-DNA (10 µl Ligationsansatz oder 10 ng Plasmid-DNA für die Retransformation) hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden

die Bakterien einem 5 minütigen Hitzeschock bei 37 °C unterzogen. Unmittelbar danach wurden die Zellen für 2 min auf Eis abgekühlt. Die Zellsuspension wurde mit 300 µl SOC Medium aufgefüllt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation aufkonzentriert bevor sie auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. Nach 12-16 h wurden einzelne Kolonien zur Vermehrung von der Platte isoliert und in 3 ml LB-Flüssigselektionsmedium unter Schütteln bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert.

2.2.16. Plasmid-Mini-/Maxipräparation durch Alkalische Lyse

2.2.16.1. Prinzip

Die Plasmid „Mini-Prep“ Methode eignet sich, um DNA in kleinen Mengen aus Bakterien zu gewinnen. Die „Maxi-Prep“-Methode wird hingegen benutzt, um große Mengen an DNA zu erhalten. Beide Methoden basieren auf dem Prinzip der alkalischen-SDS Lyse zur Extraktion von Plasmid-DNA aus chromosomaler DNA und Zellbestandteilen. Die entsprechenden Kits enthalten Säulen aus Silikamembranen, an denen die Plasmid-DNA bindet und gereinigt werden kann. Aufgereinigte Plasmid-DNA kann mittels Wasser von der Säule eluiert werden.

2.2.16.2. Durchführung

Die Übernachtskulturen wurden durch Zentrifugation (3 min, 8000 rpm für Minipräparation/ 10 min, 6000 rpm für Maxipräparation) pelletiert. Die Mini-/Maxipräparation wurde mit dem peqGOLD Kit nach den Herstellerangaben durchgeführt.

Zur Erhöhung der Reinheit der DNA nach einer Maxipräparation wurde eine Phenol/Chloroform-Fällung durchgeführt. Dazu wurde das DNA Pellet in 500 µl Wasser aufgenommen und mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Nach kurzem Mischen wurde für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. 400 µl der oberen Phase wurden dann mit 400 µl Chloroform gemischt und für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. 300 µl der oberen Phase wurden dann mit 825 µl Ethanol (96%) und 30 µl Natriumacetat versetzt und nach Mischen für 30 min bei -20 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 13000 rpm für 20 min wurde das Pellet mit Ethanol (75%) gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in 300-400 µl Wasser aufgenommen.

Sämtliche DNA Präparationen wurden durch einen analytischen Verdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

2.2.17. DNA-Isolierung mittels QIAamp DNA Blood Mini Kit

2.2.17.1. Prinzip

Zur Isolierung von DNA aus tierischen Zellen wurde das QIAamp DNA Blood Mini Kit verwendet. Hierbei werden mittels spezieller Puffer und dem Enzym Proteinase K die Zellen lysiert und die Nukleinsäuren stabilisiert. Die DNA bindet dann spezifisch an die QIAamp Silika-Gel Membran der Säule. Durch entsprechende Salz und pH-Konditionen können Proteine und andere Kontaminanten nicht an die Säule binden und passieren diese. Weitere Waschschrte entfernen PCR Inhibitoren wie divalente Kationen und übrige Proteine. Die gereinigte DNA kann anschließend mit Wasser eluiert werden [85].

2.2.17.2. Durchführung

Bis zu 5×10^6 Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 200 μ l PBS aufgenommen. Nach Zugabe von 25 μ l Proteinase K und 200 μ l AL Puffer wurden die Zellen bei 56 °C für 10 min inkubiert. Es wurden 200 μ l Ethanol (96%) zugefügt und gemischt. Danach wurde der Ansatz auf die Säule überführt. Die anschließenden Waschschrte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde mit 100 μ l Wasser eluiert.

2.2.18. Isolierung von RNA mittels TRIzol

2.2.18.1. Prinzip

Bei der Isolierung von RNA ist es wichtig, die sehr stabilen RNasen möglichst schnell von der RNA zu trennen. TRIzol ist eine einphasige Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat. Es erhält die Integrität der RNA, während Zellen zerstört und Zellbestandteile gelöst werden. Guanidinisothiocyanat lysiert die Zellen durch seinen chaotropen Charakter und inaktiviert gleichzeitig RNasen und andere Enzyme. Im Phenol lösen sich DNA und Proteine. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich

die Lösung in eine wässrige und eine organische Phase. Nach dem Transfer der wässrigen Phase in Isopropanol kann die RNA durch Zentrifugation gefällt werden. Durch abschließendes Waschen mit 75%-igem Ethanol werden Salz- und Isopropanolreste entfernt.

2.2.18.2. Durchführung

1-10×10⁶ Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1200 rpm, 5 min pelletiert und anschließend mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 800 µl TRIzol resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 160 µl Chloroform wurde die Lösung gründlich durch vortexen gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm und 10 °C. Danach wurde die obere Phase (420 µl) in 280 µl Isopropanol überführt. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA durch eine 30 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm, 10 °C gefällt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zwei mal mit 75%-igem Ethanol gewaschen. Nach einer kurzen Trocknung des Pellets bei Raumtemperatur wurde die RNA in Tris-EDTA resuspendiert.

2.2.19. Konzentrationsbestimmung von gelöster DNA/RNA

2.2.19.1. Prinzip

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden. Die Basen der Nukleinsäuren enthalten aromatische Ringe, die für die Absorption von Licht im UV-Bereich verantwortlich sind. Aus der Extinktion der Lösung kann die Konzentration bestimmt werden. 1 OD_{260 nm} entspricht 50 µg/ml dsDNA, 40 µg/ml RNA und 33 µg/ml ssDNA. Für die Messung wird die Nukleinsäure in Wasser oder Tris-EDTA gelöst und ggf. verdünnt. Die Reinheit von Nukleinsäurelösungen ist am Quotient der OD₂₆₀/ OD₂₈₀ (Ratio 260/280) messbar. Die aromatischen Aminosäurereste in den Proteinen verursachen eine Absorption bei 280 nm und lassen somit Rückschlüsse auf die Reinheit der DNA bzw. RNA zu. Für reine DNA-Lösungen sollte der Quotient OD_{260 nm}/ OD_{280 nm} bei ca. 1,8, für reine RNA-Lösungen bei ca. 2 liegen.

2.2.19.2. Durchführung DNA

Alle Messungen wurden in einer Quartzküvette durchgeführt. Ein Aliquot der Probe wurde 1:100 mit Wasser verdünnt. Am Photometer wurde zuerst ein Blindwert mit Wasser erstellt und danach die DNA-Proben gemessen. Die Konzentration und der Quotient $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ wurden bestimmt.

2.2.19.3. Durchführung RNA

Die Konzentration und Reinheit von RNA-Proben wurde mittels NanoDrop bestimmt. Die Quotienten $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ und $OD_{230\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ wurden zur Qualitätsanalyse herangezogen.

2.3. Zellbiologische Methoden

2.3.1. Kultivierung humaner/muriner Zelllinien

2.3.1.1. Prinzip

Mithilfe der Zellkultur lassen sich Zellzyklus und viele andere Aktivitäten von Zellen unter definierten Bedingungen untersuchen. Man kann viele verschiedene Tier- und Pflanzenzellen dem Organismus entnehmen und in einer künstlichen Umgebung studieren. Daneben gibt es eine Reihe standardisierter Zelllinien aus verschiedensten Geweben für spezielle Anwendungen. Die Zellen werden in definierten Medien von Glukose, Salzen, Aminosäuren und Vitaminen kultiviert. Je nach Zelltyp ergänzt man das Medium mit weiteren Komponenten wie zum Beispiel Serum, Wachstumsfaktoren oder Spurenelementen. [76]

2.3.1.2. Durchführung

Die adhärennten Zelllinien HuH-7 und 293 wurden in DMEM, 1000 U/ml Penicillin/Streptomycin und 10% hitzeinaktiviertem FCS kultiviert. Die verwendeten Suspensionzelllinien Kasumi-1, U937, K562 und 32D Δ trkA wurden in RPMI-1640, 1000 U/ml Penicillin/Streptomycin und 10% hitzeinaktiviertem FCS kultiviert. 32D-ctrl Zellen wurden in WEHI-3B konditioniertem (10%) RPMI-1640, 1000 U/ml Penicillin/Streptomycin

und 10% hitzeinaktiviertem FCS kultiviert. Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 37 °C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ gehalten.

Zum Passagieren wurden die Suspensionszellen in der Zählkammer gezählt. Anschließend wurden die Zellen zu 2×10^5 /ml in frischem Medium ausgesät. 32D-ctrl und 32D Δ trkA wurden zu 1×10^5 /ml in frischem Medium ausgesät.

293 wurden durch Klopfen an der Kulturflasche von dieser gelöst, resuspendiert und nach dem Zählen mit einer Zellzahl von $0,02 \times 10^6$ /cm² in frischen Medium ausgesät. HuH-7 Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, nachdem das Medium entfernt wurde. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA (0,05%, 0,02%) überschichtet. Nach einer Inkubation bei 37 °C für ca. 5 min wurden die Zellen durch leichtes Klopfen vom Boden der Flasche gelöst und sofort in FCS-haltigem Medium aufgenommen und gezählt. Anschließend wurden die Zellen zu $0,02 \times 10^6$ /cm² in frischen Medium ausgesät.

Zur Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblau wurden 10 μ l der Zellsuspension mit 10 μ l 0,4% Trypanblau gemischt und in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Das Trypanblau diffundiert durch die zerstörten Zellmembranen von toten Zellen und färbt diese blau.

2.3.2. Kryokonservierung von Zellen

2.3.2.1. Prinzip

Da Altern und Differenzierungen in der laufenden Zellkultur oft ein Problem darstellen, kann man durch die Kryokonservierung von Zellen den Erhalt einer homogenen Ausgangspopulation sichern. Dies ist, im Vergleich zur Zellkultur, mit geringem Aufwand verbunden. Ein wesentliches Problem der Kryokonservierung besteht jedoch in der Bildung von Eiskristallen im Medium bei ca. -5 °C, während die Zellbestandteile bei diesen Temperaturen noch nicht gefroren sind. Erniedrigt man die Temperatur nun schnell, gefrieren auch diese Bestandteile und die Zellen nehmen Schaden. Daher ist ein langsames Einfrieren für das Überleben der Zellen wichtig. Intrazelluläres Wasser diffundiert aus den Zellen und gefriert außerhalb. Es wird daher empfohlen die Temperatur um 1 °C pro Minute zu senken. Als kryoprotektives Agens wird DMSO in einer Konzentration von 10% zum Einfriermedium gegeben [86].

Das Auftauen der Zellen sollte zügig erfolgen, um die Bildung von Eiskristallen während der Rehydrierung zu vermeiden. Sobald die Zellsuspension verflüssigt ist, muss das toxische

DMSO heraus gewaschen werden.

2.3.2.2. Durchführung

Zum Einfrieren der Zellen werden diese pelletiert und in Einfriermedium (RPMI, 10% DMSO, 20% FCS) zu einer Zellzahl von 1×10^6 bis 1×10^7 aufgenommen. Es wurden jeweils 1-1,5 ml der Zellsuspension in Kyroröhrchen gefüllt und in speziellen Einfrierboxen über Nacht bei -80°C eingefroren. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der eingefrorenen Zellen erfolgte schnell bei 37°C . Anschließend wurde die Zellsuspension direkt in ein 15 ml Röhrchen mit RPMI, 10% FCS gegeben und bei 750 rpm für 5 min zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in entsprechender Zelldichte und Medium mit 20% FCS aufgenommen und bei 37°C kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen einmal gewaschen, um erste tote Zellen aus der Kultur zu entfernen.

2.3.3. Behandlung mit RAD001/ Rapamycin

2.3.3.1. Prinzip

RAD001 und Rapamycin sind Makrolid-Antibiotika mit immunsuppressiven Eigenschaften. Diese Medikamente inhibieren mTOR, jedoch nur, wenn es mit Raptor im mTORC1 Komplex vorliegt. TSA (Trichostatin A) ist ein Histondeacetylase-Inhibitor (HDACI). HDACIs modifizieren die Chromatinstruktur und erhöhen so die Erreichbarkeit von Promotorstrukturen. Dies führt zu einer erhöhten Transkription [87]. Sasaki et. al haben gezeigt, dass TSA in Kasumi-1 die Proliferation bei Konzentrationen von 10-20 ng/ml hemmt [88]. Weiterhin konnten Nishioka et al. zeigen, dass RAD001 die Effekte von HDACIs auf AML Zellen verstärken kann [87]. Daher wurden für einzelne Experimente TSA und RAD001/Rapamycin gemeinsam eingesetzt.

2.3.3.2. Durchführung

HuH-7 wurden zur Analyse der Effekte von RAD001/Rapamycin in Triplikat zu 6000 Zellen/Well in eine 96-Well Platte ausgesät. Nachdem die Zellen am Boden angeheftet

waren, wurden die Zellen mit RAD001/Rapamycin in Konzentrationen von 0,5-100 nM behandelt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit DMSO behandelt. Die Effekte wurden nach 24 h mittels BrdU-Assay analysiert.

Suspensionszellen wurden zu 2×10^5 /ml in einer 48-Well Platte ausgesät. Es wurden entsprechende Konzentrationen von RAD001/Rapamycin und 0 oder 25 ng/ml TSA zugefügt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit DMSO behandelt. Die Zellzahl wurde nach 24 h mittels Trypanblau-Ausschluß bestimmt.

2.3.4. BrdU Zellproliferationsassay

2.3.4.1. Prinzip

Bromodesoxyuridin (BrdU) ist ein chemisches Analogon des Nukleotids Thymidin. Durch Zugabe dieser Substanz zur Zellkultur wird BrdU anstelle des Thymidins während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. Nach einer Fixierung und Denaturierung der Zellen kann mithilfe spezieller Peroxidase konjugierter Antikörper, die gegen das BrdU gerichtet sind, die stattgefundene DNA-Synthese immunhistochemisch nachgewiesen werden. Durch Zugabe entsprechender Substrate kann die Reaktion dann mittels ELISA-Reader ausgewertet und so die relative Proliferation der Zellen bestimmt werden. Das BrdU weist somit direkt die Proliferation der Zellen nach und bestimmt diese nicht indirekt, wie z.B. ein MTT Assay, das die metabolische Aktivität der Zellen misst. Somit ist das BrdU Assay ein äußerst sensibles Instrument zur Proliferationsanalyse.

2.3.4.2. Durchführung

Zur Bestimmung der Proliferation von adhären Zellen wurde das Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) Assay verwendet. Die Durchführung orientierte sich an den Herstellerangaben. Die adhären HuH-7 Zellen wurden zu 6000 Zellen/ Well in eine 96-Well Platte in Triplikat ausgesät. Nachdem die Zellen an die Oberfläche der Platte angeheftet waren, wurden sie entweder mit Medikamenten, bzw. entsprechenden Placebo-Kontrollen behandelt oder direkt das BrdU Assay durchgeführt. Das BrdU wurde zu den Zellen gegeben und die Zellen für 5 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Medium von den Zellen durch Absaugen entfernt. Durch Zugabe der FixDenat Lösung für 30 min, wurden

die Zellen bei Raumtemperatur fixiert. Nach dem Entfernen der FixDenat Lösung wurde der Anti-BrdU-POD Antikörper zugefügt und für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3× mit PBS gewaschen, bevor die TMB-Substratlösung zugegeben wurde. Je nach Dauer der Farbentwicklung wurde nach 5-15 min die Absorption bei 370 nm gemessen.

2.3.5. Generierung lentiviraler Überstände

2.3.5.1. Prinzip

Lentivirale Überstände werden durch eine transiente Ko-Transfektion dreier Plasmide in 293 Zellen produziert: (i) ein Verpackungsplasmid, (ii) ein Hüllplasmid und (iii) ein Transgenplasmid (s. S. 13, vgl. Abb.1.3, S. 14).

2.3.5.2. Durchführung

Drei Tage vor Transfektionsbeginn wurden 4×10^6 293 Zellen in einer mit Poly-L-Lysin (0,01%- Lösung) beschichteten 175 cm² Flasche, in 25 ml DMEM ausgesät. Die subkonfluente Kultur wurde dann mit 40 µg lentiviralem Transgenplasmid, 30 µg Verpackungsplasmid und 20 µg Hüllplasmid mithilfe der Kalziumphosphatmethode transfiziert. Dazu wurden die Plasmide mit 122 µl CaCl₂ (2 M) versetzt und auf 2 ml mit Wasser aufgefüllt. Die DNA-Mischung wurde tröpfchenweise unter Luftblasenbildung in 2 ml HBS-Puffer (2×HBS: 50 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄, 280 mM NaCl, pH 6,95-7,0) gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das verbrauchte Medium wurde von den Zellen entfernt und durch 12 ml DMEM supplementiert mit 0,033% Chloroquin ersetzt, um die Effizienz der Transfektion zu erhöhen. Chloroquin hemmt die lysosomalen DNasen, indem es den pH-Wert innerhalb der Vesikel neutralisiert. Das DNA-Präzipitat wurde dann zu den Zellen gegeben. Nach 8 h wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und zur Steigerung der Expression mit Natriumbutyrat (1%-ige Lösung) für weitere 16 h induziert. Nach dieser Zeit wurde das Medium durch RPMI ersetzt. Der lentivirale Überstand wurde nach weiteren 24 h gesammelt und durch einen 0,45 µm Filter filtriert, um Zellbestandteile zu entfernen. Anschließend wurden die Viruspartikel durch Zentrifugation bei 10 °C, 10000×g für 16 h konzentriert. Die Virusüberstände wurden getitert und bei -80 °C gelagert.

Zur Bestimmung des Virustiters wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe, beginnend bei 4 µl Virus bis 0,03 µl, in eine 96-Well Platte vorgelegt. Dann wurden 1×10^5 Kasumi-1 Zellen

und 4 µg/ml Polybrene zugefügt. Der Ansatz wurde für 90 min bei 2500 rpm und 32 °C spinokuliert und anschließend bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Ansatz in eine 48-Well Platte mit einem Endvolumen von 1 ml überführt. Am Tag 4 nach der Transduktion wurde die Effizienz durchflusszytometrisch, durch Analyse der GFP Expression, bestimmt. Die Anzahl GFP-positiver Zellen wurde in Relation zur eingesetzten Virusmenge gesetzt. Die Viruspartikel pro ml konzentriertem Virusüberstand konnte so kalkuliert werden. Durchschnittlich wurde ein Virustiter von 7×10^8 erreicht.

2.3.6. Transduktion humaner/muriner Zelllinien

2.3.6.1. Prinzip

Bei der Transduktion bringt ein Virus das Zielgen in die Zellen ein. Ein wesentlicher Vorteil der Transduktion gegenüber einer transienten Transfektion ist die stabile Integration des Virus, und damit der Transfgene, in das Genom der Zielzelle. Dadurch erzielt man eine stabile Genexpression über einen langen Zeitraum.

Zur Transduktion von Zellen gibt man eine bestimmte Menge viraler Partikel zur Zellkultur. Die MOI (*Multiplicity of Infection*) gibt das Verhältnis der Viruspartikel pro Zelle an. Zur Erhöhung der Transduktionseffizienz kann man die viralen Partikel auf die Zellen spinokulieren. Des Weiteren erhöht die Zugabe von Polybrene zum Transduktionsansatz die Transduktionseffizienz. Polybrene ist ein Polykation, das die Ladung auf der Zelloberfläche abschirmt und dadurch das Eindringen des Virus in die Zelle erleichtert.

2.3.6.2. Durchführung

Zur Transduktion von Kasumi-1 Zellen wurden 5×10^5 Zellen/500 µl in einer 48-Well Platte ausgesät. K562 Zellen wurden zu $7,5 \times 10^5$ Zellen/1 ml in einer 24-Well Platte ausgesät. Es wurden 4 µg/ml Polybrene und Viruspartikel in einer MOI von 2 zugefügt. Anschließend wurden die Zellen für 90 min bei 2500 rpm und 32 °C spinokuliert. Nach einer Inkubation für 16 h bei 37 °C wurden die Zellen zu 2×10^5 / ml ausgesät. Die Analyse der Transduktionseffizienz erfolgte am Tag 4 nach Transduktion. Hierzu wurde der prozentuale Anteil GFP-positiver Zellen sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) durchflusszytometrisch bestimmt.

32D-ctrl und 32D Δ trkA Zellen wurden zu $1,5 \times 10^5$ Zellen/ 150 μ l in einer 96-Well Platte ausgesät. Es wurden 4 μ g/ml Polybrene und Viruspartikel in einer MOI von 4 zugefügt. Nach einer Inkubation für 16 h bei 37 °C, 5 % CO₂ wurden die Zellen zu 1×10^5 / ml ausgesät. Die Analyse der Transduktionseffizienz erfolgte am Tag 4 nach Transduktion.

Zur Transduktion von HuH-7 Zellen wurden diese am Morgen der Transduktion mit einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ /cm² ausgesät. Am Abend wurde das Medium durch frisches Medium mit 4 μ g/ml Polybrene ersetzt. Der Virus wurde in einer MOI von 2 zugefügt. Am folgenden Tag wurden die Zellen gewaschen und bei einer Zelldichte von $0,05 \times 10^6$ /cm² kultiviert. Die Analyse der Transduktionseffizienz erfolgte ebenfalls durchflusszytometrisch am Tag 4 nach Transduktion.

2.3.7. Transfektion durch Lipofektion

2.3.7.1. Prinzip

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Man bedient sich dazu verschiedener Methoden. Neben der Elektroporation und der Kalziumphosphat-Präzipitation ist die Lipofektion ein häufig genutztes Werkzeug. Hierbei wird Fremd-DNA mithilfe von Liposomen in die Zelle gebracht. Dazu wird die DNA mit einer kationischen Lipidlösung inkubiert. Es bilden sich DNA-Lipid-Komplexe, die leicht mit der Zellmembran fusionieren und von den Zellen aufgenommen werden können. Neben einer transienten Transfektion, bei der die in die Zelle gebrachte DNA nicht in das Genom der Zelle eingebaut wird, kann man durch den Gebrauch von Selektionsgenen auch stabile Effekte erzielen. Als Selektionsgene nutzt man häufig Antibiotika wie Hygromycin oder Puromycin, um transfizierte Zellen in Antibiotika-haltigem Medium zu selektionieren.

2.3.7.2. Durchführung

Zur Lipofektion von 293 Zellen wurden 1×10^5 je Well in einer 24-Well Platte ausgesät. Nach dem Adhärenieren der Zellen sollten diese zu ca. 70% konfluent sein. Zur Transfektion wurde Lipofectamine 2000 nach den Herstellerangaben verwendet. Soweit nicht anders beschrieben wurden 100 nM Oligonukleotid oder 0,5 μ g Plasmid in 50 μ l Medium ohne FCS mit 2 μ l Lipofectamine 2000 in 50 μ l Medium ohne FCS vermischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium wurde vorsichtig von den Zellen abgesaugt und

durch 400 µl frisches Medium ersetzt. Dann wurde der Lipofektionsansatz tröpfchenweise zu den Zellen pipettiert.

2.3.8. Luziferase Assay

2.3.8.1. Prinzip

Um Interaktionen zwischen biologischen Molekülen zu detektieren bedient man sich häufig eines Reporter-gen Assay. Hierbei reagiert ein Molekül von Interesse mit einem Zielgen, das mit einem Reporter-gen (oft Luziferase) fusioniert ist. Diese Interaktion resultiert in einer Degradation des Reporters, welche quantifiziert werden kann. Als Normalisierungskontrolle dient in diesem System ein Co-Reporter. Mit dessen Hilfe kann man zwischen spezifischen und unspezifischen zellulären Antworten unterscheiden und Transfektionseffizienzen normalisieren. Firefly und *Renilla* Luziferasen sind häufig genutzte Reporter.

Firefly Luziferase ist ein 61 kDa und *Renilla* Luziferase ein 36 kDa Protein. In Anwesenheit von Luziferin reagieren diese Luziferasen mit Sauerstoff zu energiereichen, instabilen Dioxetanen. Beim Zerfall dieser Substanzen kommt es zur Biolumineszenz. Im Gegensatz zur Firefly Luziferase benötigt die *Renilla* Luziferase kein ATP für die Reaktion.

Die Verwendung des Plasmids psiCHECK-2 ermöglicht ein einfaches Beobachten des RNAi Effektes. Durch die Initiierung des RNAi Prozesses wird das, an das Reporter-gen fusionierte Zielgen zerschnitten und abgebaut. Dies führt zur Reduktion der Luziferase Aktivität (vgl. S. 49). Auf diese Weise kann man direkte miRNA:mRNA Interaktionen untersuchen.

2.3.8.2. Durchführung

In einer 24-Well Platte wurden 1×10^5 Zellen 293 ausgesät und nach folgendem Schema lipofiziert.

Ansatz für Lipofektion		
Ansatz	Plasmid 1	Plasmid 2
A	psiCHECK-2	S-miR30-ctrl-IEW
B	psiCHECK-2	S-miR30-miR100-IEW
C	psiCHECK-2- <i>Targetsites</i>	S-miR30-ctrl-IEW
D	psiCHECK-2- <i>Targetsites</i>	S-miR30-miR100-IEW

Da Lipofectamin toxische Eigenschaften hat, wurde das Medium ca. 7 h nach der Lipofektion durch frisches Medium ersetzt. Nach weiteren 24 h wurde das Luziferase Assay durchgeführt. Es wurde das Dual-Glo Luciferase Assay System verwendet.

Das Medium wurde von den Zellen entfernt und durch 200 µl einer 1:1 Mischung DMEM ohne FCS und Luziferase Reagenz ersetzt. Nach ca. 10 min wurden 150 µl der lysierten Zellen in eine schwarze 96-Well Flachbodenplatte überführt, um die Firefly Luziferaseaktivität zu messen. Dies erfolgte mit dem Mithras Multiplaterereader der Firma Berthold. Nach Messung der Firefly Luziferase wurde durch Zufügen von 75 µl STOP-Reagenz und *Renilla* Substrat die Firefly Reaktion gestoppt und die *Renilla* Reaktion eingeleitet. Die Biolumineszenz wurde nach 10 min gemessen.

2.3.9. Durchflusszytometrie

2.3.9.1. Prinzip

Die Durchflusszytometrie, auch als FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) bezeichnet, ist im wesentlichen die Analyse optischer Eigenschaften einzelner Zellen. Eine Zellsuspension wird als Flüssigkeitsstrom durch einen Lichtstrahl geleitet. Das Durchflusszytometer misst, wie einzelne Zellen das Licht reflektieren, absorbieren oder welche Fluoreszenzen sie emittieren. Dazu gibt es verschiedene Parameter. Ein wesentlicher ist das Streulicht. Je nachdem in welchem Winkel man das Streulicht misst, erhält man unterschiedliche Informationen der Zelle. Das Vorwärtsstreulicht (FSC= *forward scatter*) hängt von der Größe einer Zelle ab. Kleine Zellen verursachen ein kleines Vorwärtsstreulichtsignal, große Zellen erzeugen große Signale. Neben dieser Analyse im flachen Winkel zum Laserstrahl wird das Seitwärtsstreulicht (SSC= *sidewards scatter*) im rechten Winkel zum eintretenden Laserstrahl gemessen. Der SSC hängt neben der Größe der Zellen auch stark von ihrer Granulität ab. Die Ergebnisse einer solchen Analyse können in einem *Dot-Blot* dargestellt werden. Man kann durch Auftragen von FSC (x-Achse) und SSC (y-Achse) verschiedene Zellpopulationen analysieren.

Eine weitere Möglichkeit des Durchflusszytometer ist die Analyse der fluoreszierenden Eigenschaften von Zellen. Je nach Gerät kann man bis zu 5 verschiedene Fluoreszenzen messen. Durch verschiedene Laser werden die Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission angeregt. Die so entstandenen Signale werden dann gemessen. Mit dieser Methode kann man z.B. die Oberflächenproteine, sogenannte *cluster of differentiation* (CD), der Zellen untersuchen.

Mittels speziellen, gegen bestimmte Oberflächenproteine gerichteten, fluoreszenzmarkierten Antikörpern kann man den Zellen einen bestimmten Differenzierungsstatus zuordnen. Eine andere Möglichkeit der Anwendung ist die Auswertung einer Propidiumiodid-Färbung (PI). PI gelangt durch die perforierte Zellmembran toter Zellen in diese und interkaliert dort mit der DNA. Die Menge interkalierten PIs ist somit ein Maß für die Zahl nicht vitaler Zellen. PI hat ein Emissionsmaximum von 617 nm.

2.3.9.2. Durchführung

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und dann in entsprechende FACS-Röhrchen überführt. Zur Bestimmung der GFP Expression wurden die Zellen direkt mittels FACS analysiert, nachdem die Grundeinstellungen mit einer Wildtyp-Zelllinie eingestellt wurden.

Für die PI-Färbung von Zellen wurden diese direkt aus der Zellkultur genommen und 1:1 mit PI gemischt. Ein zusätzliches Waschen würde nicht vitale Zellen aus der zu untersuchenden Probe entfernen und das Ergebnis verfälschen.

Am Durchflusszytometer wurden zuerst FSC und SSC so eingestellt, dass die Zellen mittig in einem *Gate* lagen. Danach wurden die Fluoreszenzen eingestellt und logarithmisch gemessen.

2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.4.1. Herstellung von Gesamtzell-Lysaten

2.4.1.1. Prinzip

Zur Herstellung von Gesamtzell-Lysaten werden die Zellen in entsprechenden Lysispuffern aufgenommen. Diese sind zusätzlich mit verschiedenen Proteaseinhibitoren versetzt, um die Proteine zu stabilisieren. Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) ist ein irreversibler Inhibitor von Serinproteasen. Nartiumfluorid inhibiert Serin- und Threoninphosphatasen. Natriumorthovanadat wirkt als Inhibitor von Tyrosin- und alkalischen Phosphatasen. Der Calpain Inhibitor I ALLN inhibiert nicht-lysomale Cystein Proteasen. MG-132 reduziert

die Degradation von Ubiquitin assoziierten Proteinen. Weiterhin gibt es Protease Inhibitor Cocktails, die ein weites Spektrum verschiedenster Proteasen inhibieren.

2.4.1.2. Durchführung

Für die Proteinextraktion wurden ca. 1×10^7 Zellen bei 10°C , 1200 rpm für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 10 ml kaltem PBS, 1 mM Natriumorthovanadat resuspendiert und erneut zentrifugiert. Zur Lyse der Zellen wurde das Pellet je nach Größe in 50-150 μl Tris-Lysispuffer resuspendiert und für 15-30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 13000 rpm, 10°C für 15 min abgetrennt und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Proteinlysate wurden zur Lagerung bei -80°C eingefroren.

Zusammensetzung des Tris-Lysispuffer			
RIPA		Zusätze	
50 mM	Tris-HCl (pH 7,5)	1 \times	Protease Inhibitor Cocktail III
150 mM	NaCl	2 mM	PMSF
5 mM	EDTA	25 mM	NaF
1%	Triton X-100	5 mM	TSPP
0,5%	Na-Deoxycholat	5 mM	Na_3VO_4
0,1%	SDS	25 μM	ALLN
		40 μM	MG-132

2.4.2. Proteinbestimmung nach Bradford

2.4.2.1. Prinzip

Das Bradfordassay ist eine colorimetrische Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen. Durch hydrophobe und andere Wechselwirkungen bindet der Triarylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 an die Proteine. Der Farbstoff bindet vor allem basische und aromatische Aminosäurereste, wie z.B. Arginin. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm [89]. Das Bradfordassay ist über einen weiten Bereich nutzbar und kann Proteinkonzentrationen im μg Bereich erfassen.

2.4.2.2. Durchführung

Die Proteinbestimmung wurde in einem Volumen von 100 µl in einer 96-Well Platte durchgeführt. Dazu wurden die zu untersuchenden Proben 1:10 mit Wasser verdünnt und in einer 1:2 Verdünnungsreihe analysiert. Ein mitgeführter BSA-Standard (3 mg/ml) wurde gleich behandelt. Nach Zugabe von 100 µl Bradfordreagenz wurde die Extinktion bei 595 nm mithilfe eines ELISA-Readers gemessen. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden mithilfe einer BSA-Eichgerade bestimmt.

2.4.3. Sodiumdodecyl-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

2.4.3.1. Prinzip

Die SDS-PAGE ist eine besondere Form der Polyacrylamidgelelektrophorese. Neben der Verwendung von Gelen auf Polyacrylamidbasis wird das zu untersuchende Proteinlysate in einem Sodiumdodecylsulfat (SDS)-haltigem Puffer gelöst.

SDS ist ein anionisches Detergenz, dass mit einem konstantem Verhältnis von 1,4 g/g Protein an Proteine bindet und diese denaturiert. Es zerstört alle nicht-kovalenten Bindungen im Protein, welches dadurch Quartär-, Tertiär- und Sekundärstrukturen verliert. Die starke negative Ladung des SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine, so dass man ein konstantes Ladung/Masse Verhältnis erhält. Dadurch ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molmasse und der elektrophoretischen Mobilität der Proteine.

Die Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid wird durch Ammoniumpersulfat und Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator initiiert [89]. Um die Proteine mit SDS zu beladen, werden diese in entsprechenden Ladepuffern mit 2% SDS und 5% Mercaptoethanol aufgenommen und bei 95 °C denaturiert. 10% Glycerol im Ladepuffer erhöht die Dichte der Probe, so dass eine Vermischung mit dem Elektrodenpuffer beim Auftragen der Proben vermieden werden kann.

2.4.3.2. Durchführung

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde nach Schägger durchgeführt [90]. Die Proteine wurden zunächst in einem niederprozentigem Sammelgel fokussiert und dann in

einem höherprozentigem Trenngel aufgetrennt. Zur Präparation der Gele wurden vorgefertigte Plastikgelkassetten der Firma Invitrogen benutzt. Je nach Proteingröße wurden 4-6 %-ige Sammelgele und 6-8 %-ige Trenngele verwendet.

Laufpuffer für Tricingele	
Konzentration	Substanz
3 M	Tris
0,3%	SDS
pH 8,45	

Zusammensetzung der Polyacrylamidgele			
Sammelgele		Trenngele	
10-15% (v/v)	Acrylamid/Bis Solution 40%	15-20% (v/v)	Acrylamid/Bis Solution 40%
25% (v/v)	Laufpuffer für Tricine-Gele	13,3% (v/v)	Glycerin
60-65% (v/v)	ddH ₂ O	33,3% (v/v)	Laufpuffer für Tricine-Gele
		33,3-38,3% (v/v)	ddH ₂ O
0,1% (w/v)	APS	0,1% (w/v)	APS
0,1% (v/v)	TEMED	0,1% (v/v)	TEMED

Zunächst wurde das Trenngel bis auf ca. 2 cm unterhalb des Randes in die Plastikgelkassette gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Isopropanol vorsichtig abgegossen und mit einem Filterpapier vollständig entfernt. Nun wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und sogleich der Kamm für die Geltaschen eingesetzt. Nach der Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gesetzt welche mit Kathoden- und Anodenpuffer gefüllt wurde. Die Geltaschen wurden nach dem Entfernen des Kamms mit Kathodenpuffer gespült.

Zusammensetzung der Puffer			
Kathodenpuffer		Anodenpuffer	
1 M	Tris-Base	0,5 M	Tris-Base
		0,5 M	Tricine
		0,5% (w/v)	SDS
pH 8,9		pH 8,25	

Es wurden Proteinmengen zwischen 75 und 100 µg analysiert. Das entsprechende Volumen wurde mit 9 µl NuPage Sample Reducing Agent und 1 µl 10×NuPage LDS Sample

Buffer gemischt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach dem Abkühlen der Proben auf Eis wurden diese in die Taschen des Geles gegeben. Zur Fokussierung der Proteine im Sammelgel wurde für ca. 15 min eine Spannung von 7,5 V/cm angelegt. Danach wurde die Elektrophorese bei einer Spannung von 20 V/cm durchgeführt, bis eine ausreichende Trennung der Proteine erzielt war.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel vorsichtig aus der Plastikgelkassette entfernt und die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert.

2.4.4. Western Blot

2.4.4.1. Prinzip

Der Begriff *Blotting* umfasst im Allgemeinen den Transfer biologischer Proben von einem Gel auf eine Membran und ihre anschließende Detektion auf der Oberfläche der Membran. Die Methode des Western Blotting oder auch Immunoblotting wurde 1979 von Towbin beschrieben [91]. Hierbei werden Proteine, die über eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt wurden durch Anlegen einer Spannung aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Proteine liegen dann immobilisiert als Spiegelbild des Gels auf der Membran. Die Effizienz diese Transfers hängt von verschiedenen Faktoren ab. Zum einen migrieren die Proteine unterschiedlich schnell aus dem Gel und binden unter bestimmten Konditionen verschieden stark an die Membran. Zum anderen beeinflussen experimentelle Einstellungen wie z.B. die Konsistenz des Gel, die Dauer und Stärke der angelegten Spannung oder die Konstitution der Puffer den Transfer. Niedrigionische Puffer bei einer niedrigen Stromstärke bieten gute Bedingungen für einen Proteintransfer.

In einem nächsten Schritt wird die Membran „geblockt“, um unspezifische Antikörperbindungen auf dieser zu vermeiden. Dies geschieht meist mit Milch oder speziellen Block-Puffern. Nun können die Proteine über spezifische Antigen-Antikörper Reaktionen detektiert werden. Hierbei unterscheidet man zwischen direkter und indirekter Detektion. Während bei der direkten Detektion das Protein von Interesse mit einem Enzym-markierten Antikörper interagiert, wird bei der indirekten Detektion zunächst ein primärer Antikörper zugegeben, der das Antigen erkennt. Dann wird ein gegen, den ersten Antikörper gerichteter, sekundärer Enzym-markierter Antikörper zugefügt. Als Markierung können unter anderem Meerrettichperoxidase oder auch Alkalische Phosphatase genutzt werden, die nach

Zugabe entsprechender Substrate detektierbare Signale liefern. Ein großer Vorteil der direkten Detektion ist die Schnelligkeit der Methode, da nur ein Antikörper genutzt wird. Allerdings sind die Signale meist schwach und das Markieren jedes einzelnen Antikörpers ist zeitaufwendig und teuer. Hier wird der Vorteil der indirekten Detektion deutlich. Viele primäre Antikörper können in einer Spezies (z.B. *rabbit*) hergestellt werden. Für diese wird dann nur ein markierter sekundärer Antikörper benötigt (*anti-rabbit*). Des Weiteren ist diese Methode sensitiver, da jeder Primärantikörper mehrere Sekundärantikörper an verschiedenen Epitopen binden kann und so das Signal verstärkt wird.

2.4.4.2. Durchführung

Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer getrennt und das Sammelgel entfernt. Alle Bestandteile zum Aufbau des "Blottingsandwiches" wurden in $1\times$ Transferpuffer getränkt.

Zusammensetzung Transferpuffer	
Konzentration	Substanz
25 mM	Tris-Base
192 mM	Glycin
20% (v/v)	Methanol
pH 8,3-8,4	

Zuerst wurden zwei Schwämme in die Blotkammer gelegt, dann folgten 2×3 MM Whatman Papiere. Auf diese wurde das Gel gebracht. Als nächstes folgte die Nitrocellulosemembran, 2×3 MM Whatman Papiere und wieder zwei Schwämme. Das "Blottingsandwich" wurde nun verschlossen, in die Blot-Kammer eingesetzt und mit Transferpuffer gefüllt. Zur Kühlung wurde kaltes Wasser in den Außenraum der Kammer gegeben. Der Transfer wurde für 2 h bei 35 V vollzogen. Anschließend wurde die Membran in speziellen Inkubationsboxen unter Rotation für 1 h in 5 %-iger Magermilchlösung inkubiert, um freie Bindungen auf der Membran zu blockieren. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung in 5 %-iger Magermilchlösung unter Rotation bei 4 °C über Nacht. Danach wurde die Membran $3\times$ für 15 min mit PBS-Tween-20-Puffer (0,05 %) gewaschen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Der Sekundärantikörper wurde wie oben beschrieben verdünnt und für ca. 1 h bei Raumtemperatur unter Rotation mit der Membran inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Membran $3\times$ für 15 min mit PBS-Tween-20-Puffer (0,05 %) gewaschen.

Zum enzymatischen Nachweis der Antikörperreaktion wurden die Amersham ECL-Detektionslösungen I und II im Verhältnis 1:1 gemischt. Dieses ECL-Gemisch wurde dann zur Membran gegeben und für zwei Minuten im Dunkeln geschwenkt. Dabei reagiert das an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidaseenzym mit dem im ECL enthaltenen Wasserstoffperoxid. Hierdurch kommt es zu einer Änderung der Ringkonformation des Luminols, ebenfalls im ECL-Gemisch enthalten, und letztlich zur Lichtemission. Ein Röntgenfilm wurde dann in der Dunkelkammer auf die Membran gelegt und die Filmkassette verschlossen. Je nach zu detektierendem Protein und verwendetem Antikörper wurde der Film für 0,5-15 min exponiert und mittels Filmentwicklungsmaschine entwickelt. Zur exakten Quantifizierung der Banden wurde die Membran anschließend mit dem VersaDoc MP Imaging System gescannt und mit der Quantity One Software quantifiziert.

2.5. In-Silico Analysen

2.5.1. Statistische Analysen mittels R und Bioconductor

2.5.1.1. Prinzip

Für einen statistischen Test ist zunächst die Formulierung einer Nullhypothese (H_0), einer Aussage über die Gleichheit zweier Zustände, nötig. Die Alternativhypothese (H_1) ist die Formulierung über den Unterschied bezüglich einer Fragestellung. Da es für jede Fragestellung unmöglich ist die Grundgesamtheit zu betrachten, beschränkt man sich auf eine Zufallsstichprobe. Diese wird dann jeweils aus der Grundgesamtheit gezogen. Als nächstes wird ein Effektmaß für jede Zufallsstichprobe geschätzt. Dies kann z.B. der Mittelwert oder der Median sein. Zur Überprüfung, ob zwei gezogene Zufallsstichproben derselben Grundgesamtheit angehören, nutzt man als Teststatistik den t-Test. Hierbei überprüft man die Unterschiede zwischen zwei Gruppen indem man auf den Standardfehler der Differenz dieser Gruppen normiert.

$$t = \frac{\text{Differenz der Stichprobenmittelwerte}}{\text{Standardfehler der Differenz der Stichprobenmittelwerte}}$$

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{S_x^2 - S_y^2}}$$

Wenn x und y aus derselben Grundgesamtheit stammen, also die Nullhypothese wahr ist, dann sind die Varianzen S_x^2 und S_y^2 Schätzer für die Varianz δ^2 der Grundgesamtheit. Der t-Wert ist somit abhängig vom Unterschied zwischen den Mittelwerten zweier Gruppen und

den Elementen, die für die Stichprobe herangezogen wurden. Daraus folgt, wenn t klein ist, dann stammen die beiden Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit [92] [93].

Für diese Art der Analyse ist das Festlegen einer Irrtumswahrscheinlichkeit α , das Signifikanzniveau, nötig. Hierbei soll der Fehler 1. Art, nämlich das die Nullhypothese abgelehnt wird, obwohl sie richtig ist, begrenzt werden. Häufig gewählte Niveaus sind $\alpha = 0,05$ oder $\alpha = 0,01$. Das besagt, dass zu 99,95% bzw. 99,99% die Ablehnung der Nullhypothese den wahren Zustand widerspiegelt. Der p -Wert steht in engem Zusammenhang mit dem Signifikanzniveau. Er spiegelt die Wahrscheinlichkeit wieder, dass, unter der Annahme, die Nullhypothese sei wahr, die Teststatistik den beobachteten oder einen extremeren Wert annimmt. Üblicherweise legt man für einen Test zunächst das Signifikanzniveau α fest. Die Nullhypothese wird dann verworfen, wenn der sogenannte p -Wert kleiner oder gleich α ist. Ein kleiner p -Wert spricht somit für die statistische Signifikanz der Ergebnisse und führt zur Annahme der Alternativhypothese. Der p -Wert hängt von der Stärke des beobachteten Effektes, der Variabilität der Daten und der Größe der Stichprobe ab. Daher liefern große Stichproben oft sehr kleine p -Werte. Weiterhin muss man beachten, dass der p -Wert nur eine Aussage darüber macht, ob ein Unterschied vorliegt, nicht wie groß dieser ist [92] [93].

Der t -Test eignet sich gut für den Vergleich von zwei Gruppen. Analysiert man nun mehrere Parameter für 2 Gruppen, wie z.B. bei einem Mikroarray, wird die t -Statistik ungenau. In einem t -Test wird die Varianz für jeden Parameter einzeln geschätzt, was zur Instabilität führt. Mithilfe eines moderaten t -Tests wird nun versucht die Varianz über alle Parameter zu schätzen, um so die Varianzschätzung zu korrigieren. Weiterhin besteht das Problem, dass in einem Mikroarray tausende von Hypothesen gleichzeitig getestet werden. Daher erwartet man z.B. für 10000 analysierte Gene und einem p -Wert von 0,01, dass $10000 \times 0,01 = 100$ Gene in jedem Fall einen signifikanten p -Wert besitzen. Als einfaches Beispiel kann man sich eine Urne mit 20 Kugeln vorstellen von denen eine rot, die übrigen blau sind. Wenn man nun einmal eine Kugel aus der Urne zieht, ist die Wahrscheinlichkeit eine rote Kugel zu ziehen $1/20 = 5\%$. Wenn man jedoch 20 mal zieht erhöht sich diese Wahrscheinlichkeit auf 64%. Dies spiegelt dann nicht mehr den wahren Zustand wieder und bedarf einer Korrektur für mehrmaliges Ziehen, sogenanntes multiples Testen. Es erhöht sich also die Chance falsch-positive Ergebnisse zu erzielen. Um dies zu vermeiden werden die p -Werte für multiples Testen korrigiert [92] [93].

Ein einfaches und häufig genutztes Verfahren ist die Fehlerkorrektur nach Bonferroni oder Benjamini und Hochberg. Für die Bonferroni-Fehlerkorrektur wird der p -Wert jedes Gens

mit der Anzahl der getesteten Gene multipliziert. Dadurch ergibt sich ein sehr stringentes Verfahren, welches jedoch auch falsch-negative Ergebnisse liefert. Die Ermittlung der Benjamini und Hochberg *False Discovery Rate* (FDR) ist weniger stringent. Die FDR resultiert in weniger falsch-negativen, aber auch mehr falsch-positiven Ergebnissen. Zur Ermittlung der FDR werden die p -Werte vom Kleinsten zum Höchsten gelistet. Der höchste Wert bleibt wie er ist. Der zweithöchste Wert wird mit der Anzahl der Gene multipliziert und durch seinen Rang geteilt [94].

$$p_{korr} = p - Wert \times \frac{n}{n-2}$$

Für den dritt-Höchsten p -Wert wird analog verfahren.

$$p_{korr} = p - Wert \times \frac{n}{n-3}$$

2.5.1.2. Durchführung

Für die statistischen Auswertungen wurden die Datensätze in entsprechende *csv*-Formate konvertiert und mittels R und Bioconductor analysiert. Die Daten wurden mit einem moderaten t -Test und Fehlerkorrektur nach Benjamini und Hochberg auf unterschiedliche miRNA Expression analysiert. Anschließend wurden die Daten nach ihrer miRNA Expression geclustert. Es wurden sogenannte *Heatmaps* generiert, um eine farbkodierte Darstellung der Ergebnisse zu erreichen.

Das vollständige R-Skript für die gesamten Analysen befindet sich im Anhang 5.1.

2.5.2. Analyse von mikroRNA Zielgenen

2.5.2.1. Prinzip

Die verschiedenen Programme zur Bestimmung der miRNA Zielgene werden an anderer Stelle beschrieben (s. S. 12).

2.5.2.2. Durchführung

Die Analyse der miRNA Zielgene wurde zunächst mithilfe der Open Source Programme PicTar und TargetScan durchgeführt. Aufgrund der Vielzahl an resultierenden Zielgenen

wurde auf eine Analyse mittels MicroCosm verzichtet. Da die ersten beiden genannten Programme gleiche Ergebnisse lieferten, wurden die folgenden Analysen basierend auf dem TargetScan Algorithmus durchgeführt.

Zur weiteren Analyse der miRNA Zielgene wurden die in TargetScan gefundenen Zielgene in einer automatisierten *Batch*-Analyse (*OTTO*;-) und dem RNA22 Programm analysiert. Das Programm *OTTO* wurde in unserem Labor geschrieben und analysiert automatisch Listen von Genen durch Einlesen in den RNA22 Algorithmus. Weiterhin wird durch Farbkodierung die genaue Position der miRNA Bindungsstelle in der mRNA angezeigt. Als Standardeinstellung wurde ein *Mismatch* in einer *Seed*-Sequenz von 7 Nukleotiden erlaubt. Die minimale Anzahl gepaarter Basen in der Heteroduplex betrug 14. Als maximale Faltungsenergie wurde -25 kcal/mol zugelassen.

2.5.3. Analyse der Signalwege

2.5.3.1. Prinzip

si/shRNAs werden konstruiert um einzelne Gene spezifisch zu inhibieren. miRNA hingegen können aufgrund ihrer geringen Größe und einer *Seed*-Sequenz von nur 8 Nukleotiden eine Vielzahl von Genen regulieren. Die biologische Rolle von miRNAs für einzelne Zielgene ist in einer Vielzahl von Publikationen beschrieben. Die Rolle der miRNA für eine *multitarget* Regulierung ist hingegen wenig bekannt. Li et al. identifizierten jedoch eine Signalkaskade, die von nur einer miRNA reguliert wird. Die miRNA-181a fungiert als Modulator der T-Zell Sensitivität und Selektion durch Regulierung einer Reihe von Phosphatasen, die die T-Zell-Rezeptor Signalkaskade regulieren [95]. Die miRNA reguliert dabei ihre Zielgene, im Gegensatz zu den äußerst effektiven si/shRNAs, nur auf moderate Weise, um die Sensitivität der T-Zellen zu verändern. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass miRNAs evolutionäre Genregulatoren sind, die durch eine Regulation von Gen-Netzwerken eine ganzheitliche biologische Funktion ausüben. Daher erscheint es sinnvoll innerhalb der miRNA Zielgene nach Anhäufungen in Signalwegen oder Gen-Netzwerken zu suchen.

GenMAPP ist ein Open Source Programm zur Visualisierung von Genexpressionen und anderen genomischen Daten auf Karten, die biologische Signalwege oder Gengruppen repräsentieren. In der GenMAPP Datenbank ist ein weites Spektrum an Signalwegen hinterlegt, die vorwiegend auf der KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) Daten-

bank basieren. Weiterhin besteht die Möglichkeit selbständig Signalwege zu konstruieren und zu hinterlegen. Mit dem Programm MAPPFinder kann man dann in Gen-Datensätzen nach einer Anhäufung von Genen in bestimmten Signalwegen oder Gengruppen suchen.

2.5.3.2. Durchführung

Die Signalweg-Analysen wurden mit dem Programm GenMAPP2 und MAPPFinder durchgeführt. Nach Formatierung der Datensätze wurden diese als *Gen Expression Dataset* in das Programm eingelesen und eine Farbkodierung für die Zielgene festgelegt. Anschließend wurden die in GenMAPP2 hinterlegten Signalkaskaden und Gen-Netzwerke auf eine Anhäufung der miRNA-Zielgene untersucht.

3. Ergebnisse

3.1. Patientenkohort

Primäres Ziel dieser Arbeit war die Analyse differenziell exprimierter miRNAs bei der akuten myeloischen Leukämie und Vorläuferzellen. Für diese Analysen wurde ein Patientenkollektiv aus AML Patienten und Normalpersonen zusammengestellt.

Tabelle 3.1.: Klinische Daten zur Patientenkohorte

Chromosomale Veränderung	weitere	Anzahl	Ø CD34 Gehalt	Ø Alter
Normal		13	74%	65
Komplex		9	72%	62
	11q23	1	93%	69
	45X0	1	89%	76
Monosomie 7		3	56%	62
	t(3;3)	2	82%	73
	t(1;8)	1	45%	36
inv(16)		8	75%	46
	+8	1	93%	59
t(8;21)		10	72%	52
PB-MNC		7	93%	
KM		4	92%	
TOTAL		60	78%	60

Zur Analyse der miRNA Expression bei der Leukämie wurden 49 AML Patienten mit einer AML Erstdiagnose analysiert. Hierzu wurden CD34+ Zellen aus dem Knochenmark oder peripheren Blut der Patienten aufgereinigt. Der CD34 Gehalt der Proben lag nach dieser Aufreinigung bei $\geq 50\%$, eine Probe besaß einen CD34 Gehalt von 45%. Für die Analysen wurden AML Proben mit normalen Karyotyp (n=13), komplexen Karyotyp (n=11), Monosomie 7 (n=6), Inversion 16 (n=9) und Translokation (8;21) (n=10) untersucht. Als Kontrollgruppe wurden aufgereinigte CD34+ Zellen (CD34 $\geq 90\%$) des peripheren Blutes

(PB-MNC, n=7) und des Knochenmarks (KM, n=4) von Normalpersonen analysiert. Tabelle 3.1 zeigt eine Zusammenfassung der Patientendaten. Der gesamte Kohort umfasste 60 Proben verschiedener Patienten und Normalspender. Der durchschnittliche CD34 Gehalt lag bei 78%. Das Alter reichte von 28 bis 78 Jahren, das Durchschnittsalter betrug 60, der Median 62 Jahre.

3.2. RNA Qualität

Die Analyse der miRNA Expression mittels miChip Mikroarray erfordert RNA in hoher Qualität. Daher wurden für diese Analysen nur Proben mit ausreichender RIN (*RNA Integrity Number*) und Ratio 260/280 analysiert. Die RNA wurde aus aufgereinigten CD34+ Zellen des peripheren Blutes (PB-MNC, CD34 \geq 95%, n=4), des Knochenmarks (BM, CD34 \geq 90%, n=4), sowie 22 AML Proben (CD34 \geq 50%, normaler Karyotyp n=5, komplexer Karyotyp n=4, -7 n=4, inv(16) n=4, t(8;21) n=5) mittels Trizol isoliert (vgl. Tab. 3.2).

Tabelle 3.2.: Qualitätsanalyse der RNA für die Analyse mittels miChip

Probe	n	\emptyset RIN	SD RIN	\emptyset Ratio 260/280	SD Ratio 260/280
normaler Karyotyp	5	5,4	2,40	1,6	0,08
komplex Karyotyp	4	8,3	0,71	1,5	0,13
Monosomie 7	4	4,0	1,47	1,5	0,22
inv(16)	4	5,4	2,89	1,4	0,10
t(8;21)	5	6,9	0,86	1,5	0,13
PB-MNC	4	8,1	nd	1,8	0,20
BM	4	2,5	nd	nd	nd
TOTAL	30	5,8		1,5	

Die Qualität der RNA wurde mittels Agilent Bioanalyzer analysiert. Die RIN wird auf einer Skala von 1-10 gemessen. Eine RIN von 1 deutet auf degradierte RNA hin, eine RIN von 10 spricht hingegen für RNA von hoher Qualität. Die mittlere RIN der analysierten Proben betrug 5,8. Weiterhin betrug die Ratio 260/280 \geq 1,5.

Neben der Analyse mittels miChip wurde die Expression ausgewählter miRNAs mittels miR-qRT-PCR bestimmt. Für diese Methode werden nur sehr geringe Mengen RNA benötigt. Es wurden, neben den mittels miChip analysierten Patienten, zusätzliche Proben analysiert. Die durchschnittliche RIN dieser Proben betrug 3,4. Die mittlere Ratio 260/280

dieser zusätzlichen Proben betrug 1,5. Insgesamt wurden 30 zusätzliche Proben in die weiteren Untersuchungen eingeschlossen (PB-MNC n=3, normaler Karyotyp n=8, komplexer Karyotyp n=7, -7 n=2, inv(16) n=5, t(8;21) n=5). Eine Zusammenfassung der Daten ist in Tabelle 3.3 zu finden.

Tabelle 3.3.: Qualitätsanalyse der RNA für weiter Analyse mittels miR-qRT-PCR

Probe	n	ØRIN	SD RIN	Ø Ratio 260/280	SD Ratio 260/280
normaler Karyotyp	8	2,9	1,08	1,3	0,16
komplex Karyotyp	7	4,8	2,80	1,4	0,11
Monosomie 7	2	1,4	/	1,3	0,21
inv(16)	5	4,0	1,81	1,6	0,05
t(8;21)	5	2,9	0,59	1,4	0,09
PB-MNC	3	4,4	2,37	1,8	0,30
TOTAL	30	3,4		1,5	

3.3. miChip Mikroarray

Die in Tab. 3.2 gelisteten Patienten wurden in einer ersten Analyse mittels miChip Mikroarray bezüglich ihrer miRNA Expression untersucht. Diese Analysen wurden am EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) in Heidelberg durchgeführt. Mit dieser Methode wurde die Expression von 333 miRNAs in einem Experiment analysiert. Ein Teil dieser miRNAs konnte nicht zur Auswertung genutzt werden, da einige Sonden schlecht oder gar nicht gebunden hatten, bzw. die entsprechende miRNA nicht exprimiert war. Nach der Eliminierung dieser nicht detektierbaren miRNAs verblieben 216 miRNAs für die weitere Analyse. Um Fehler durch unterschiedliche Mengen an RNA zu vermeiden, wurden die miChip Daten auf die eingesetzte RNA Menge normalisiert. Dazu wurde die gesamte miRNA Expression einer einzelnen Probe mit der Gesamt-miRNA Expression des miChips verglichen und auf diese normalisiert.

Die normalisierten Daten wurden mithilfe der Software R und Bioconductor analysiert. Es wurde ein moderater t-Test mit Kalkulation der FDR (*false discovery rate*) nach Benjamini und Hochberg als Korrektur für multiples Testen durchgeführt. Dies ist statistisch aufgrund der Vielzahl der Daten und Tests notwendig. Für die Analysen wurden die Pakete *biobase* und *limma* genutzt (s. Anhang 5.1, S. 131). Ein vollständiges Skript der Analysen befindet sich im Anhang. Differenziell regulierte miRNAs wurden zu einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ kalkuliert. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurden *Heatmaps* erstellt.

3.3.1. Vergleich der Kontrollgruppen

Zunächst wurden die Unterschiede in der miRNA Expression zwischen CD34+ Zellen des peripheren Blutes und Knochenmarks von Normalpersonen analysiert. Dies war notwendig, da die CD34+ Zellen der AML Patienten teilweise aus den Knochenmark, teilweise aus dem peripheren Blut der Patienten stammten. Daher wurden zunächst die Unterschiede der miRNA Expression bei CD34+ Zellen unterschiedlicher Herkunft analysiert.

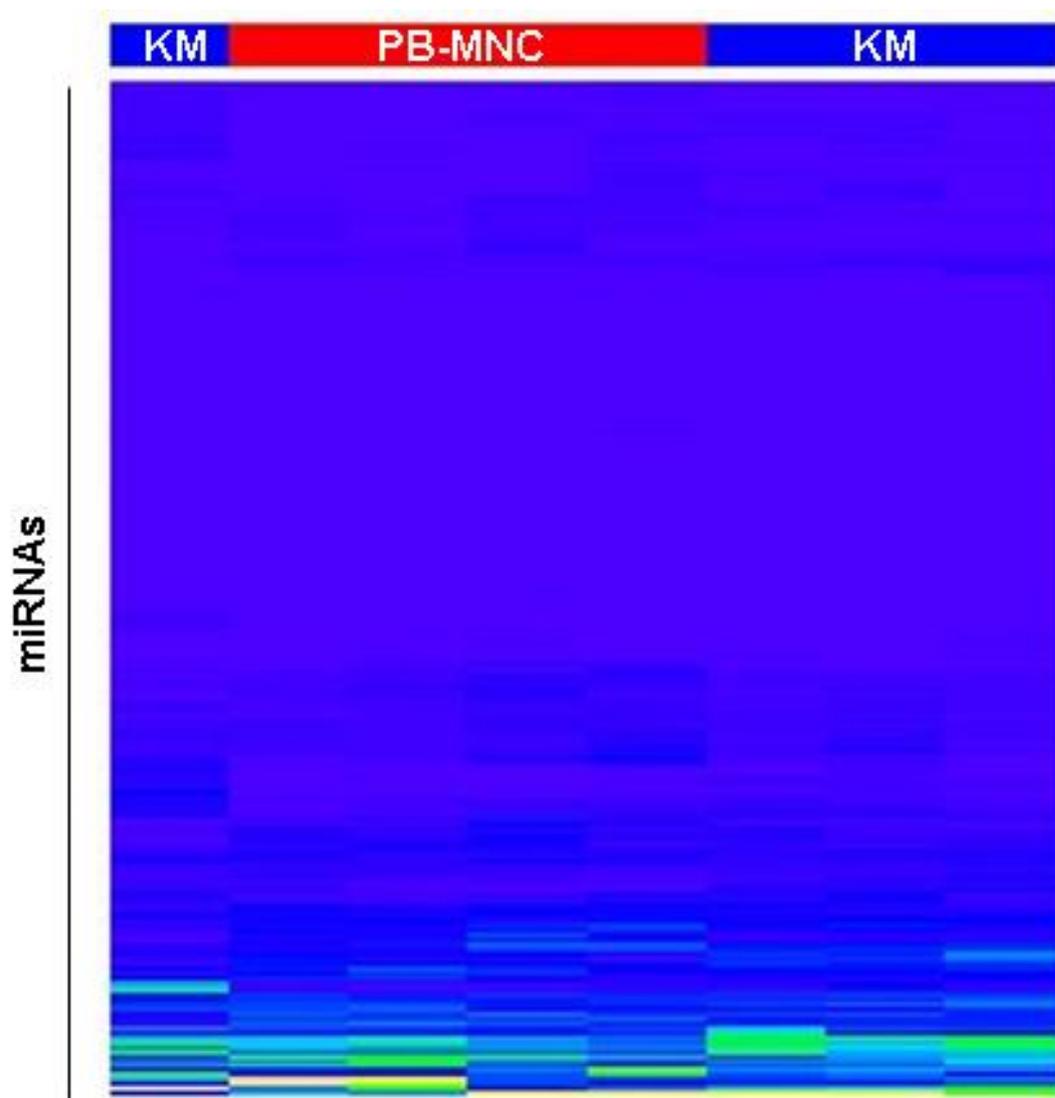


Abbildung 3.1.: Analyse der miRNA Expression in CD34+ Zellen des Knochenmarks (KM, blau) und des peripheren Blutes (PB-MNC, rot). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Die normalisierten Expressionen sind dargestellt.

Für diese Analyse wurden die miChip Daten von jeweils 4 Proben des Knochenmarks und des peripheren Blutes der Normalpersonen auf differenziell exprimierte miRNAs untersucht. Abb. 3.1 zeigt die Ergebnisse dieses Vergleiches in einer *Heatmap*. Eine eindeutige Unterscheidung der beiden Gruppen aufgrund ihrer miRNA Expression war nicht möglich. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen CD34+ Zellen des Knochenmarks und des peripheren Blutes von Normalpersonen festgestellt werden. Die miRNA Expression ist somit homogen zwischen den CD34+ Zellen isoliert aus Knochenmark und peripheren Blutes von Normalpersonen.

3.3.2. Vergleich der AML mit PB-MNC

Aufgrund der homogenen miRNA Expression von Normalpersonen, wurden für die weiteren Analysen die Expressionsdaten der CD34+ Zellen des peripheren Blutes herangezogen. Die in Tab. 3.2 aufgeführten AML Proben wurden in einer miChip Analyse mit diesen PB-MNCs verglichen.

Tabelle 3.4.: Differenziell exprimierte miRNAs bei der AML im Vergleich zu CD34+ Zellen der PB-MNCs von Normalpersonen. Ergebnisse der miChip Analyse

miRNA	FoldChange	miRNA	FoldChange
hsa-miR-422b	-15,9	hsa-miR-331	1,7
hsa-miR-422a	-4,3	hsa-miR-199b	1,8
hsa-miR-208	-4,3	hsa-miR-107	1,8
hsa-miR-425	-3,7	hsa-miR-501	2,7
hsa-miR-513	-3,6	hsa-miR-372	2,7
hsa-miR-99b	-3,5	hsa-miR-512-3p	2,7
hsa-miR-10a	-3,2	hsa-miR-27b	3,0
hsa-miR-335	-3,1	hsa-miR-374	3,2
hsa-let-7d	-2,9	hsa-miR-186	3,4
hsa-miR-100	-2,8	hsa-miR-484	3,8
hsa-miR-516-5p	-2,8	hsa-miR-193a	3,8
hsa-miR-214	-2,8	hsa-miR-367	5,0
hsa-miR-200b	-2,6	hsa-miR-223	5,3
hsa-miR-383	-2,4	hsa-miR-199a*	5,3
hsa-miR-382	-2,4		
hsa-miR-215	-2,3		
hsa-miR-515-3p	-2,2		
hsa-miR-125b	-2,0		
hsa-miR-492	-1,9		
hsa-miR-185	-1,8		
hsa-miR-527-518a-2*	-1,6		
hsa-let-7e	-1,5		
hsa-miR-519e*	-1,5		
hsa-miR-500	-1,4		

In dieser Analyse konnten 38 differenziell exprimierte miRNAs zwischen den beiden Gruppen identifiziert werden. Tabelle 3.4 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

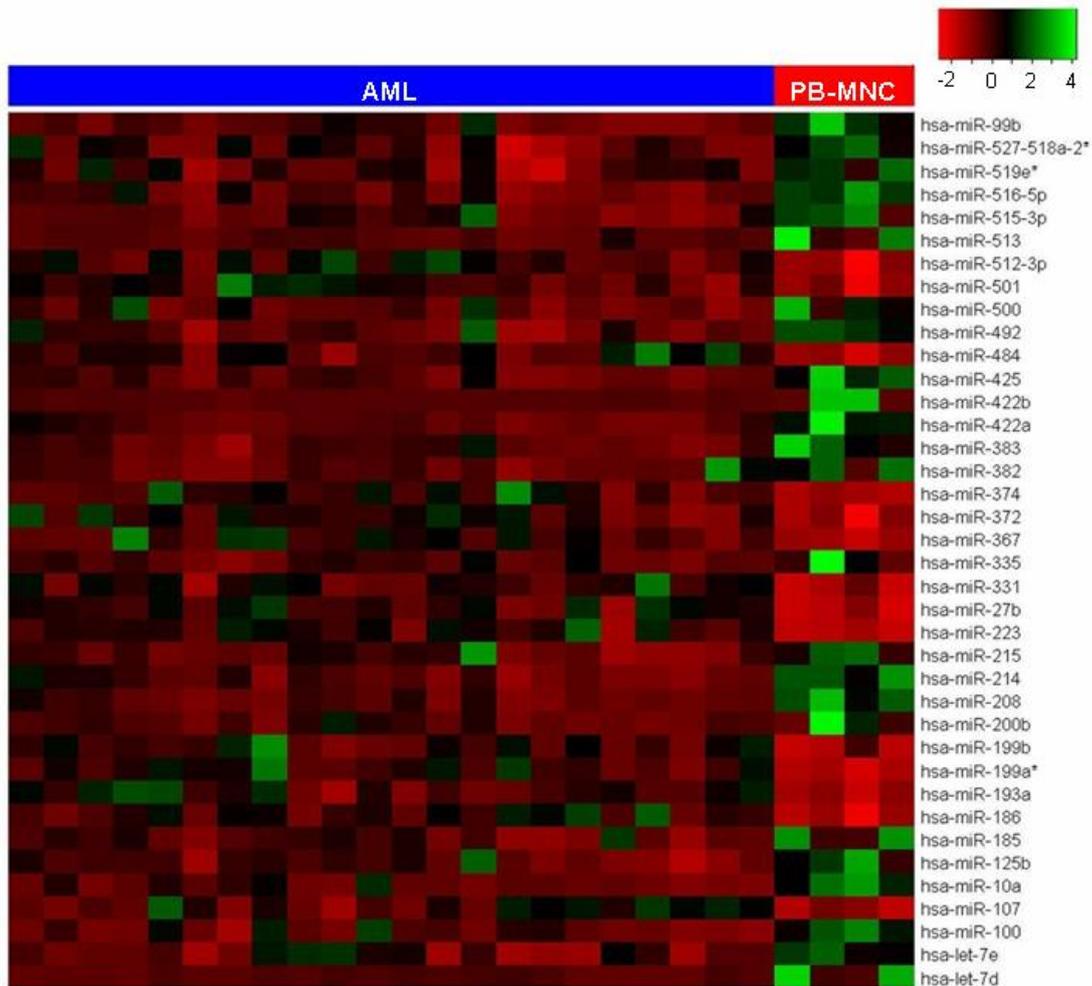


Abbildung 3.2.: Analyse differenziell exprimierter miRNAs bei der akuten myeloischen Leukämie (AML, blau) und PB-MNCs von Normalpersonen (rot).

14 miRNAs (36,8%) zeigten eine signifikant erhöhte Expression bei CD34+ Zellen der AML im Vergleich zu PB-MNCs. Durchschnittlich waren die miRNAs 3,3-fach überexprimiert, der Median betrug 3,1-fach. Die Werte reichten von 1,7-fach für die miR-331 bis 5,3-fach für die miR-199a*. 24 miRNAs (63,2%) zeigten bei CD34+ Zellen der AML eine signifikant niedrigere Expression im Vergleich zu CD34+ Zellen von gesunden Spendern. Im Mittel waren die miRNAs 3,2-fach niedriger exprimiert, der Median betrug -2,7-fach. Die miR-422b zeigte mit einer reduzierten Expression von -15,9-fach den deutlichsten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Eine moderate, aber dennoch signifikant erniedrigte Expression von -1,4-fach wurde für die miR-500 gemessen (vgl. Tab. 3.4).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die miRNA Expression in Proben aus aufgereinigten CD34+ Zellen von AML Patienten und CD34+ Zellen aus PB-MNCs von Normalpersonen heterogen ist. Ca. 60% der differenziell regulierten miRNAs sind bei der AML niedriger exprimiert. Die übrigen 40% zeigten eine verstärkte Expression bei den AML Proben. Diese Ergebnisse sind in der *Heatmap* Abb. 3.2 visualisiert.

3.3.3. Vergleich von miChip und miR-qRT-PCR

Für die weiteren Analysen wurde untersucht, ob sich diese Ergebnisse mit einer weiteren Methode reproduzieren lassen. Dazu wurde die miRNA Expression mittels miR-qRT-PCR analysiert und mit den Ergebnissen der miChip Analyse verglichen. Aufgrund der Men-

Tabelle 3.5.: Vergleich der Analysemethoden zur Bestimmung differenziell exprimierter miRNAs. MiRNAs mit signifikanten Unterschieden zwischen Proben der AML und PB-MNCs nach miChip Analyse, wurden mit den Ergebnissen einer miR-qRT-PCR Analyse verglichen.

miRNA	FC miChip	FC PCR	p-Wert, PCR
hsa-let-7e	-1,5	1,6	ns.
hsa-miR-100	-2,8	-1,3	ns.
hsa-miR-107	1,8	1,6	ns.
hsa-miR-10a	-3,2	-34,4	$\leq 0,001$
hsa-miR-186	3,4	2,0	ns.
hsa-miR-199a*	5,3	5,1	$\leq 0,0001$
hsa-miR-214	-2,8	10,9	$\leq 0,0001$
hsa-miR-223	5,3	5,5	$\leq 0,0001$
hsa-let-27b	3,0	-1,2	ns.
hsa-miR-331	1,7	1,8	ns.
hsa-miR-374	3,2	2,8	$\leq 0,05$
hsa-miR-422a	-4,3	3,1	$\leq 0,01$
hsa-miR-425	-3,7	4,6	$\leq 0,0001$
hsa-miR-484	3,8	1,7	ns.
hsa-miR-492	-1,9	2,0	ns.
hsa-miR-99b	-3,5	-2,8	ns.

ge an Daten wurden 16 miRNAs mit signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen mithilfe der miR-qRT-PCR untersucht. Die Auswertung erfolgte über die $\Delta\Delta Ct$ -Methode nach Schmittgen [80]. Als endogene Kontrolle wurde entweder die miR-15b oder miR-197 gewählt, da diese miRNAs im miChip die stärkste Homologie zwischen Proben der PB-MNCs und AML Proben zeigten. Neben den mittels miChip untersuchten Patientenproben wurden weitere Proben für die Analyse mithilfe der miR-qRT-PCR untersucht (s. Tab. 3.3). Die kalkulierten ΔCt -Werte reflektieren eine relative Expression der miRNA.

Diese Daten wurden mithilfe der Software R und Bioconductor analog zu den miChip Daten analysiert (vgl. Kapitel 3.3, S. 77).

Die Tabelle 3.5 zeigt einen Vergleich der miChip und miR-qRT-PCR Analyse. Gelistet sind die signifikanten, differenziell exprimierten miRNAs der miChip Analyse, die zusätzlich mittels miR-qRT-PCR analysiert wurden. Hierbei zeigen 10 der 16 untersuchten miRNAs mit beiden Methoden ähnliche Expressionsprofile im Vergleich der AML Proben zu den PB-MNCs (miR-100, miR-107, miR-10a, miR-186, miR-199a*, miR-223, miR-331, miR-374, miR-484, miR-99b). Vier dieser miRNAs zeigten mit beiden Methoden signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (miR-10a, miR-199a*, miR-223, miR-374). Die übrigen 6 miRNAs zeigten gleiche Expressionsprofile, Signifikanz konnte jedoch nur in der miChip Analyse nachgewiesen werden.

Die miRNAs let-7e, miR-214, miR-27b, miR-422a, miR-425 und miR-492 zeigten unterschiedliche Expressionsprofile mit den verschiedenen Analysemethoden. MiR-214, miR-422 und miR-425 zeigten in der miChip und miR-qRT-PCR Analyse signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, jedoch mit entgegengesetzten Expressionsprofilen. Insgesamt wurden somit 62,5% Übereinstimmung bei den miRNA Expressionsprofilen mit den beiden verschiedenen Methoden gefunden.

3.4. Vergleich der AML Subgruppen mit PB-MNC

In den weiteren Analysen wurde die miRNA Expression der einzelnen AML Subgruppen mit den PB-MNCs von Normalpersonen verglichen. Über diese Methode sollten für die entsprechenden Subgruppen spezifische, differenziell regulierte miRNAs identifiziert werden. Dazu wurden die miChip Daten der verschiedenen AML Subgruppen (normaler Karyotyp, komplexer Karyotyp, -7, inv(16) und t(8;21)) getrennt voneinander mit den Proben der PB-MNCs verglichen. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.3.

Neben der miChip Analyse wurden zusätzliche Untersuchungen mittels miR-qRT-PCR durchgeführt. Auch hier erfolgte die Auswertung über die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode nach Schmittgen [80], wobei die ΔCt -Werte für die Analyse der Expressionsprofile herangezogen wurden. Es wurden, neben den in Tab. 3.5 aufgeführten miRNAs, 28 zusätzliche miRNAs mittels miR-qRT-PCR analysiert. Die Auswahl dieser miRNAs erfolgte zum Teil nach Literaturrecherche, zum Teil nach den Expressionsprofilen der miChip Analyse. Es wurden

Tabelle 3.6.: Auflistung der mittels miR-qRT-PCR analysierten miRNAs

let-7c	miR-214	miR-30b
let-7e	miR-22	miR-30c
miR-100	miR-221	miR-320
miR-107	miR-222	miR-331
miR-10a	miR-223	miR-370
miR-142-3p	miR-23a	miR-374
miR-142-5p	miR-23b	miR-422a
miR-148a	miR-24	miR-425
miR-150	miR-26a	miR-452
miR-181a	miR-26b	miR-484
miR-181b	miR-27a	miR-492
miR-186	miR-27b	miR-510
miR-191	miR-29a	miR-518c*
miR-199a*	miR-29b	miR-99b
miR-206	miR-29c	

miRNAs ausgewählt, welche einen Einfluss auf die Hämatopoese haben können. Eine Auflistung dieser miRNAs ist in Tab. 3.6 zu finden. Weiterhin wurden für die miR-qRT-PCR Analysen zusätzliche Patientenproben eingeschlossen.

3.4.1. AML mit normalen Karyotyp

Für die Analyse der miRNA Expression mittels miChip bei AML Patienten mit normalem Karyotyp wurden 5 Proben analysiert. Diese wurden mit den Expressionsprofilen von 4 Proben der PB-MNCs verglichen. Zur weiteren Analyse mit der miR-qRT-PCR Methode wurde eine weitere Probe der PB-MNCs, sowie 7 weitere AML Patienten mit normalen Karyotyp eingeschlossen.

Mithilfe der miChip Analyse wurde für den Vergleich der AML mit normalem Karyotyp und PB-MNCs von Normalspendern 23 signifikant differenziell exprimierte miRNAs identifiziert. Eine Analyse der miRNA Expressionsprofile mittels miR-qRT-PCR zeigte 10 differenziell exprimierte miRNAs. Signifikante Unterschiede in der miRNA Expression konnten für die miRNA miR-10a (\downarrow in AML), sowie miR-142-3p, miR-199a* und miR-223 (\uparrow in AML) mit beiden Methoden nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten die miRNAs miR-107, miR-142-5p, miR-221, miR-30b und miR-374 gleiche Expressionsprofile mit beiden Analysemethoden. Eine statistische Signifikanz konnte für diese miRNAs nur teilweise nachgewiesen werden. Diese miRNAs waren bei der AML mit normalem Karyotyp im Vergleich zu PB-MNCs verstärkt exprimiert. Für die miRNAs miR-150, miR-191 und miR-22

Tabelle 3.7.: Vergleich der miRNA Expression bei AML Proben mit normalen Karyotyp mit PB-MNC Proben. Im linken Tabellenteil finden sich differenziell exprimierte miRNAs nach miChip Analyse, im rechten Teil befinden sich die Ergebnisse der miR-qRT-PCR.

miChip			miR-qRT-PCR		
miRNA	FC miChip	Signifikanz	miRNA	FC PCR	Signifikanz
hsa-let-7e	-2,2	≤0,05	hsa-miR-10a	-25,8	≤0,005
hsa-miR-107	2,1	≤0,05	hsa-miR-142-3p	4,4	≤0,05
hsa-miR-10a	-3,5	≤0,05	hsa-miR-150	6,7	≤0,001
hsa-miR-142-3p	4,3	≤0,05	hsa-miR-191	3,3	≤0,05
hsa-miR-142-5p	6,3	≤0,05	hsa-miR-199a*	3,5	≤0,05
hsa-miR-186	4,2	≤0,05	hsa-miR-206	16,4	≤0,001
hsa-miR-199a*	5,7	≤0,05	hsa-miR-214	9,9	≤0,0001
hsa-miR-206	-2,3	≤0,05	hsa-miR-22	8,0	≤0,0001
hsa-miR-208	-5,4	≤0,05	hsa-miR-223	5,2	≤0,005
hsa-miR-214	-3,8	≤0,05	hsa-miR-23b	5,0	≤0,01
hsa-miR-223	6,8	≤0,05			
hsa-miR-30b	3,3	≤0,05			
hsa-miR-30c	3,4	≤0,05			
hsa-miR-320	-2,5	≤0,05			
hsa-miR-367	4,8	≤0,05			
hsa-miR-374	4,5	≤0,05			
hsa-miR-422a	-5,6	≤0,05			
hsa-miR-425	-4,1	≤0,05			
hsa-miR-452	-2,6	≤0,05			
hsa-miR-510	-3,5	≤0,05			
hsa-miR-516-5p	-3,5	≤0,05			
hsa-miR-518*	-2,6	≤0,05			
hsa-miR-527-518a-2*	-2,1	≤0,05			

konnte mittels miR-qRT-PCR eine signifikant erhöhte Expression bei AML mit normalen Karyotyp gezeigt werden. Diese erhöhte Expression der miRNAs wurde ebenfalls in der miChip Analyse beobachtet, ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (s. Tab. 3.7). Im Gegensatz zu diesen übereinstimmenden Ergebnissen, wurden für die miR-206, miR-214 und miR-23b signifikante Unterschiede für die beiden Gruppen gefunden, der *Fold Change* war jedoch bei der Analyse mit den beiden Methoden gegenläufig.

3.4.2. AML mit komplexen Karyotyp

Für den Vergleich der AML mit komplexen Karyotyp mit PB-MNCs von Normalpersonen wurden mittels miChip jeweils 4 Proben analysiert. In weiterführenden miR-qRT-PCR Analysen wurde eine zusätzliche Probe der PB-MNCs, sowie 7 weitere Proben mit komplexen Karyotyp untersucht.

Durch eine Analyse der miChip Daten mittels R und Bioconductor wurden fünf signifikant, unterschiedlich exprimierte miRNAs zwischen den beiden Gruppen identifiziert. Mithilfe einer anschließenden miR-qRT-PCR zeigten 13 miRNAs signifikante Expressionsunterschiede bei der AML mit komplexen Karyotyp und PB-MNCs (vgl. Tab. 3.8).

Tabelle 3.8.: Vergleich der miRNA Expression bei AML Proben komplexen Karyotyps mit PB-MNC Proben. Die Ergebnisse der miChip Analyse sind im linken, die Ergebnisse der miR-qRT-PCR im rechten Tabellenteil dargestellt.

miChip			miR-qRT-PCR		
miRNA	FC miChip	Signifikanz	miRNA	FC PCR	Signifikanz
hsa-miR-150	3,0	$\leq 0,05$	hsa-miR-142-5p	2,9	$\leq 0,05$
hsa-miR-223	5,1	$\leq 0,05$	hsa-miR-150	10,4	$\leq 0,0001$
hsa-miR-27b	2,8	$\leq 0,05$	hsa-miR-191	3,8	$\leq 0,005$
hsa-miR-492	-1,9	$\leq 0,05$	hsa-miR-199a*	4,1	$\leq 0,005$
hsa-miR-516-5p	-2,5	$\leq 0,05$	hsa-miR-206	16,1	$\leq 0,005$
			hsa-miR-214	8,5	$\leq 0,005$
			hsa-miR-22	6,1	$\leq 0,01$
			hsa-miR-223	5,6	$\leq 0,001$
			hsa-miR-23b	-3,7	$\leq 0,005$
			hsa-miR-30b	2,5	$\leq 0,05$
			hsa-miR-320	2,8	$\leq 0,05$
			hsa-miR-374	3,0	$\leq 0,05$
			hsa-miR-425	5,0	$\leq 0,001$

Die miRNAs miR-150 und miR-223 zeigten hochsignifikante Unterschiede in den Expressionsprofilen von AML mit komplexen Karyotyp und PB-MNCs. Mittels miChip und miR-qRT-PCR wurde eine starke Überexpression dieser miRNAs bei AML mit komplexen Karyotyp gezeigt. Weitere Übereinstimmungen in den Expressionsprofilen wurden für die miRNAs miR-142-5p, miR-191, miR-199a*, miR-30b und miR-374 identifiziert. Diese miRNAs zeigten in der Analyse mittels miR-qRT-PCR eine signifikant erhöhte Expression beim komplexen Karyotyp. Die Daten der miChip Analyse bestätigten diese Ergebnisse. Eine Signifikanz konnte für diese miRNAs jedoch nicht nachgewiesen werden. Gegensätzliche Ergebnisse wurden für die miR-206, miR-214, miR-22, miR-23b, miR-320 und miR-425 beobachtet. Die signifikanten Expressionsprofile der miR-qRT-PCR konnten mittels miChip nicht beobachtet werden. Nicht signifikante, aber dennoch gleiche Expressionsprofile wurden für die miR-10a (\downarrow in AML), miR-148a und miR-186 (beide \uparrow in AML) beobachtet.

3.4.3. AML mit Monosomie 7

Um die miRNA Expressionsprofile der AML mit Monosomie 7 zu analysieren, wurden jeweils 4 Proben der AML und PB-MNCs mittels miChip untersucht. Zur weiteren Analyse der miRNA Expressionen mit der miR-qRT-PCR Methode wurde eine weitere Probe der PB-MNCs, sowie 2 zusätzliche Proben mit Monosomie 7 analysiert.

In dieser Untersuchung wurden acht, bzw. sieben signifikant, differenziell exprimierte miRNAs mit miChip, bzw. miR-qRT-PCR Analyse identifiziert (vgl. Tab. 3.9). Die miRNAs

Tabelle 3.9.: Vergleich der miRNA Expression bei AML Proben mit Monosomie 7 mit PB-MNC Proben. Im linken Tabellenteil sind die Ergebnisse der miChip Analyse, im rechten Teil sind die Ergebnisse der miR-qRT-PCR dargestellt.

miChip			miR-qRT-PCR		
miRNA	FC miChip	Signifikanz	miRNA	FC PCR	Signifikanz
hsa-miR-148a	7,1	≤0,05	hsa-let-7e	5,9	≤0,05
hsa-miR-199a*	7,1	≤0,05	hsa-miR-10a	-12,6	≤0,005
hsa-miR-208	-7,5	≤0,05	hsa-miR-150	11,5	≤0,001
hsa-miR-22	4,7	≤0,05	hsa-miR-199a*	5,8	≤0,01
hsa-miR-223	6,1	≤0,05	hsa-miR-206	22,3	≤0,001
hsa-miR-27b	3,7	≤0,05	hsa-miR-214	28,8	≤0,0001
hsa-miR-492	-2,4	≤0,05	hsa-miR-22	16,9	≤0,0001
hsa-miR-516-5p	-2,9	≤0,05			

miR-199a* und miR-22 zeigten bei der Monosomie 7 eine signifikante Überexpression im Vergleich zu PB-MNCs. Diese wurde mittels miChip und miR-qRT-PCR nachgewiesen. Für die miR-10a konnte mittels miR-qRT-PCR eine signifikant niedrigere Expression bei der Monosomie 7 detektiert werden. Dieser Unterschied zu PB-MNCs von Normalspendern wurde ebenfalls in der miChip Analyse beobachtet, jedoch ohne einen signifikanten Unterschied. Die miR-150 zeigt in der Analyse mit den beiden verschiedenen Methoden eine deutliche Überexpression (etwa 12-fach) bei der Monosomie 7. Signifikanz wurde jedoch nur mittels miR-qRT-PCR nachgewiesen. Die miRNAs let-7e, miR-206 und miR-214 zeigten mit beiden Methoden unterschiedliche Ergebnisse. Obwohl die miR-qRT-PCR signifikante Unterschiede dieser miRNAs in den beiden Gruppen zeigte, konnten diese in der Analyse der miChip Daten nicht beobachtet werden. Für einige miRNAs wurden in beiden Analysen gleiche Ergebnisse für den Vergleich der Monosomie 7 mit PB-MNCs beobachtet, eine Signifikanz konnte jedoch nicht mit beiden Methoden nachgewiesen werden. Hierzu zählte die erhöhte Expression der miRNAs miR-142-3p/5p, miR-148a, miR-191, miR-221, miR-223 und miR-374. Weiterhin wurde für die miR-510 mit beiden Methoden

eine erniedrigte Expression in der Monosomie 7 nachgewiesen.

3.4.4. AML mit Inversion 16

Im nächsten Schritt wurden AML Patienten mit einer Inversion 16 näher untersucht. Dazu wurden die miRNA Expressionsprofile von 5 Patienten mit denen von 4 PB-MNC Proben verglichen. Nach einer miChip Analyse wurden für die weitere miR-qRT-PCR drei zusätzliche Patienten untersucht. Weiterhin wurde eine zusätzliche Probe der PB-MNCs betrachtet.

Bei der Analyse der AML mit Inversion 16 und PB-MNCs von Normalpersonen wurden fünf differenziell exprimierte miRNAs identifiziert. Zwei dieser mittels miChip gefundenen miRNAs wurden ebenfalls mithilfe der miR-qRT-PCR Methode identifiziert. Über diese Methode wurden insgesamt 16 miRNAs mit signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen identifiziert (vgl. Tab. 3.10). Für die miRNAs miR-191 und miR-223 wurde bei

Tabelle 3.10.: Vergleich der miRNA Expression in Inversion 16 Proben mit PB-MNC Proben. Ergebnisse der miChip Analyse sind im linken, die Ergebnisse der miR-qRT-PCR im rechten Tabellenteil dargestellt.

miChip			miR-qRT-PCR		
miRNA	FC miChip	Signifikanz	miRNA	FC PCR	Signifikanz
hsa-let-7c	-1,6	≤0,05	hsa-miR-107	2,8	≤0,05
hsa-miR-181a	4,1	≤0,05	hsa-miR-10a	-22,1	≤0,005
hsa-miR-191	2,2	≤0,05	hsa-miR-142-3p	2,9	≤0,05
hsa-miR-223	5,4	≤0,01	hsa-miR-142-5p	3,0	≤0,05
hsa-miR-27b	3,1	≤0,05	hsa-miR-150	5,4	≤0,005
			hsa-miR-191	4,0	≤0,001
			hsa-miR-199a*	5,3	≤0,0001
			hsa-miR-206	21,1	≤0,0001
			hsa-miR-214	10,9	≤0,0001
			hsa-miR-22	8,5	≤0,0001
			hsa-miR-222	3,3	≤0,01
			hsa-miR-223	5,0	≤0,0001
			hsa-miR-23b	-7,6	≤0,001
			hsa-miR-422a	5,3	≤0,0001
			hsa-miR-425	4,8	≤0,0001
			hsa-miR-99b	-8,5	≤0,001

der Inversion 16 eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich zu PB-MNCs detektiert. Dies wurde mithilfe der miChip und miR-qRT-PCR nachgewiesen. Für die in der miR-qRT-PCR signifikanten Expressionen der miR-10a, miR-107, miR-142-3p/5p, miR-150,

miR-199a* und miR-99b konnte in der miChip Analyse ein gleiches Expressionsprofil festgestellt werden. Signifikante Unterschiede konnten für diese miRNAs mit dieser Methode nicht identifiziert werden. Die miR-206, miR-214, miR-22, miR-222, miR-23b, miR-422a und miR-425 zeigten, trotz statistischer Signifikanz in der miR-qRT-PCR, in der miChip Analyse gegenläufige Ergebnisse. Weiterhin konnte für die miRNAs miR-181a und miR-374 eine deutliche Überexpression bei der Inversion 16 festgestellt werden. miChip und miR-qRT-PCR lieferten hier identische, jedoch nicht statistisch signifikante Ergebnisse.

3.4.5. AML mit Translokation (8;21)

Zur Analyse der miRNA Expressionsprofile bei der AML mit Translokation(8;21) wurden 5 entsprechende Proben mit 4 Proben der PB-MNCs von Normalpersonen in einer miChip Analyse verglichen. Für die anschließende miR-qRT-PCR wurden 5 Proben der PB-MNCs, sowie 10 Proben mit Translokation (8;21) analysiert.

Tabelle 3.11.: Vergleich der miRNA Expression bei AML Proben mit Translokation (8;21) mit PB-MNC Proben. Im linken Tabellenteil sind die Ergebnisse der miChip Analyse, im rechten Teil die Ergebnisse der miR-qRT-PCR dargestellt.

miChip			miR-qRT-PCR		
miRNA	FC miChip	Signifikanz	miRNA	FC PCR	Signifikanz
hsa-miR-100	-4,6	≤0,05	hsa-miR-100	-7,9	≤0,05
hsa-miR-107	2,3	≤0,01	hsa-miR-10a	-82,7	≤0,0001
hsa-miR-10a	-4,5	≤0,01	hsa-miR-142-3p	4,0	≤0,01
hsa-miR-206	-2,9	≤0,05	hsa-miR-142-5p	4,1	≤0,01
hsa-miR-208	-5,4	≤0,05	hsa-miR-150	10,2	≤0,0001
hsa-miR-214	-4,5	≤0,01	hsa-miR-181a	2,2	≤0,05
hsa-miR-425	-4,2	≤0,05	hsa-miR-191	7,2	≤0,0001
hsa-miR-452	-2,0	≤0,05	hsa-miR-199a*	9,8	≤0,0001
hsa-miR-484	5,0	≤0,05	hsa-miR-206	13,0	≤0,005
hsa-miR-492	-2,1	≤0,05	hsa-miR-214	8,7	≤0,01
hsa-miR-516-5p	-3,5	≤0,01	hsa-miR-22	9,7	≤0,0001
hsa-miR-99b	-7,0	≤0,05	hsa-miR-221	3,3	≤0,05
			hsa-miR-222	3,1	≤0,05
			hsa-miR-223	8,1	≤0,0001
			hsa-miR-23b	-3,1	≤0,05
			hsa-miR-320	4,0	≤0,005
			hsa-miR-331	2,6	≤0,05
			hsa-miR-374	4,0	≤0,01
			hsa-miR-422a	4,7	≤0,005
			hsa-miR-425	8,3	≤0,0001
			hsa-miR-484	2,7	≤0,05

Die Untersuchung dieses Karyotyps identifizierte 12 differenziell exprimierte miRNAs bei

der Translokation (8;21). Unter diesen befanden sich zwei miRNAs der miR-99 Familie (miR-100 und miR-99b). MiRNAs einer Familie weisen eine Sequenzhomologie der *Seed*-Sequenz auf, wohingegen miRNAs eines Clusters gemeinsam transkribiert werden.

Mittels miR-qRT-PCR wurden statistisch signifikante Unterschiede in der Expression für 21 miRNAs identifiziert. Unter diesen befand sich ebenfalls die miR-100. Die miR-100 zeigte eine deutliche, signifikante Reduktion bei der Translokation (8;21) im Vergleich zu PB-MNCs. Die Signifikanz konnte mit miChip und miR-qRT-PCR bestätigt werden. Für die miR-99b wurde eine signifikante Reduktion in der Translokation (8;21) mittels miChip nachgewiesen. Die miR-qRT-PCR bestätigte dieses Ergebnis. Die miR-10a (\downarrow in AML) und miR-484 (\uparrow in AML) zeigten ebenfalls statistische Signifikanz bei der Analyse der miRNA Expression mit beiden Methoden. Die miR-206, miR-214, miR-222, miR-23b, miR-320, miR-422a und miR-425 zeigten nach Analyse mittels miR-qRT-PCR statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Diese Unterschiede wurden nicht in der miChip Analyse beobachtet, bzw. waren gegenläufig. Des Weiteren konnten die in der miR-qRT-PCR signifikanten Unterschiede in der Expression der miR-142-3p/5p, miR-150, miR-181a, miR-191, miR-199a*, miR-22, miR-221, miR-223, miR-331 und miR-374 ebenfalls mittels miChip beobachtet werden. Zusätzlich zeigten die miRNAs miR-107, miR-181b und miR-186 gleiche, jedoch nicht signifikante Expressionsprofile bei der Analyse mit beiden Methoden. Diese miRNAs zeigten eine erhöhte Expression in der AML mit Translokation (8;21).

3.4.6. Zusammenfassung des Vergleiches der AML Subgruppen mit PB-MNCs

Für die Analyse der miRNA Expressionprofile bei den einzelnen AML Subgruppen wurden verschiedene Methoden verwendet. Mittels Hochdurchsatz-Untersuchungen (miChip) wurde eine erste Analyse der miRNA Expressionen durchgeführt. Die anschließende miR-qRT-PCR diente zur gezielten Analyse einzelner Kandidaten-miRNAs. Bei der Analyse mit beiden Methoden zeigten sich oft identische Expressionsprofile für viele miRNAs. Die statistisch signifikanten Unterschiede konnten jedoch nicht immer mit beiden Methoden nachgewiesen werden. Teilweise wurden gegensätzliche Expressionsprofile für die miRNAs mit den verschiedenen Methoden detektiert. Hierzu gehörten die miR-206, miR-214, miR-222, miR-23b, miR-320, miR-422a und miR-425.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die miRNA Expression bei verschiedenen AML

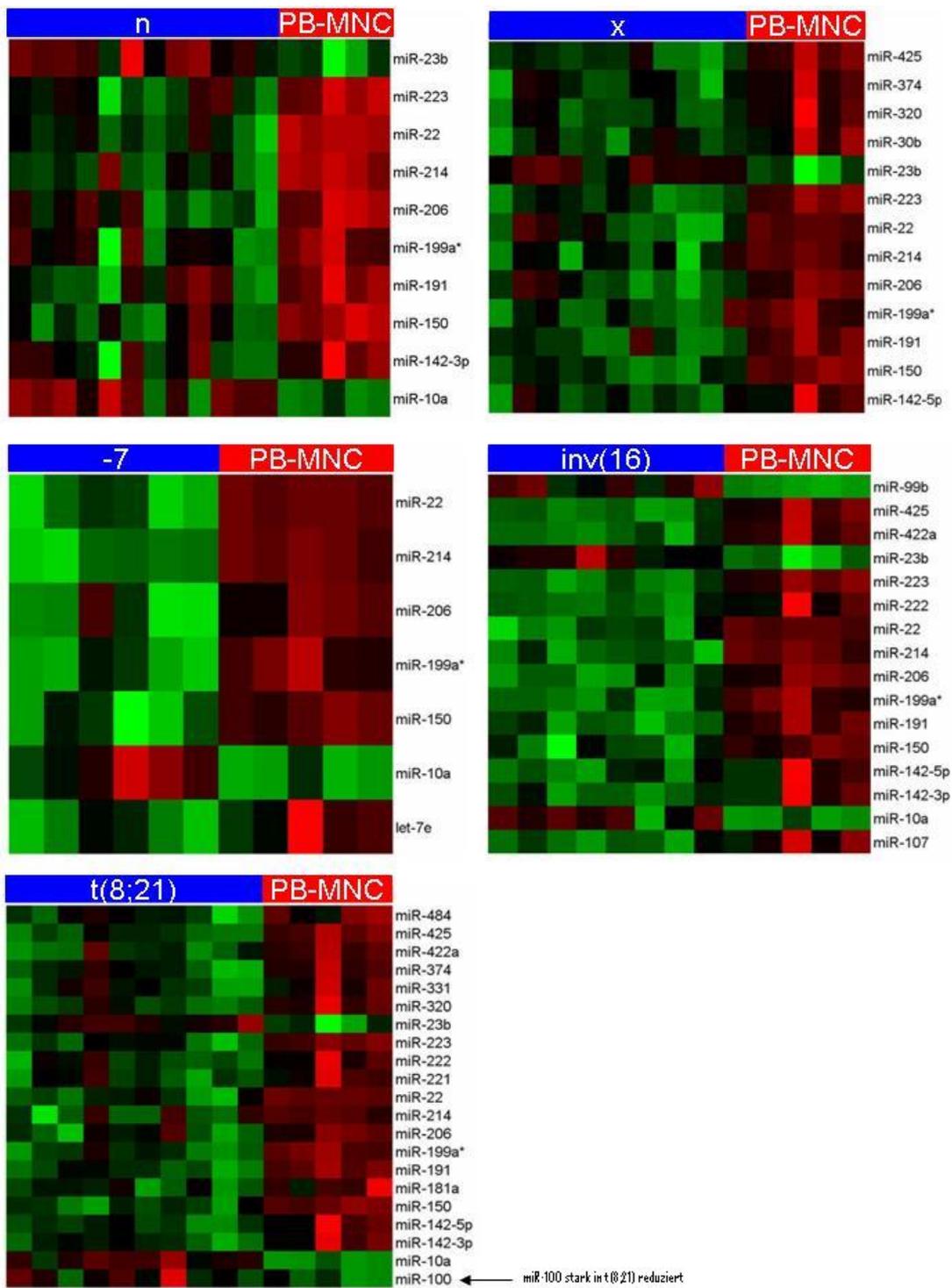


Abbildung 3.3.: Überblick über die Ergebnisse der miR-qRT-PCR Analyse. miRNAs sind bei Subgruppen der akuten myeloischen Leukämie (n: normaler Karyotyp, x: komplexer Karyotyp, -7: Monosomie 7, inv(16): Inversion 16, t(8;21): Translokation (8;21); blau) und PB-MNC (rot) differenziell exprimiert.

Subgruppen heterogen ist. Die miR-223, miR-199a*, miR-191 und miR-150 zeigten eine erhöhte Expression bei den verschiedenen AML Subgruppen. Die miR-10a war bei allen AML Subgruppen reduziert, jedoch in unterschiedlichem Maße (-6-fach im komplexen Karyotyp, -82-fach in der t(8;21)). Trotz des Wiederkehrens ähnlicher Expressionsprofile, gibt es einige miRNAs, die für Subgruppen spezifisch zu sein scheinen. Die miRNA miR-100 ist nur in der Translokation (8;21) um den Faktor 8 reduziert. In der Monosomie 7 lässt sich eine starke Reduktion der miR-510 detektieren. Weiterhin ist die miR-181a bei den *Core binding factor* Leukämien erhöht exprimiert. Abb. 3.3 zeigt eine Zusammenfassung der signifikanten Ergebnisse der miR-qRT-PCR für die einzelnen AML Subgruppen.

3.5. Analyse von mikroRNA Zielgenen

Aufgrund der starken und signifikanten Reduktion der miR-100 bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie t(8;21), wurde für diese miRNA eine genaue Zielgenanalyse durchgeführt. Zunächst wurden die Zielgene der miR-100 mittels MicroCosm, PicTar und TargetScan analysiert (s. S. 12).

3.5.1. Vorhersage von mikroRNA-Zielgen-Interaktionen

Die Analyse der miR-100 mit MicroCosm liefert 956 potenzielle Zielgene. MicroCosm liefert im Allgemeinen die größte Anzahl an Zielgenen. Dies zeigte sich auch im Vergleich zu den PicTar und TargetScan Algorithmen. 30 verschiedene Zielgene wurden mittels PicTar, 40 potenzielle Zielgene mithilfe des TargetScan Programms identifiziert. 18 Zielgene waren in der Analyse mit den Algorithmen von PicTar und TargetScan identisch. Aufgrund dieser Überschneidung der Ergebnisse wurden die weiterführenden Analysen basierend auf dem TargetScan Algorithmus durchgeführt. Die Ergebnisse des MicroCosm wurden nicht weiter berücksichtigt. Zum einen erhöht die Vielzahl der potenziellen Zielgene die Komplexität der Analyse stark, zum andern konnten nur 11 Zielgene des MicroCosm Algorithmus ebenfalls mit den PicTar und TargetScan Algorithmen identifiziert werden.

Die miR-100 besitzt, im Vergleich zu vielen anderen miRNAs, mit 40 potenziellen Zielgenen verhältnismäßig wenig Zielsequenzen. Die miR-24 etwa weist laut TargetScan ca. 500, miR-20a sogar 1000 potenzielle Zielgene auf. Aufgrund der geringen Anzahl von 40 potenziellen Zielgenen, konnten diese in einer weiteren Analyse genauer untersucht werden. Dazu wurde das Programm RNA22 (s. S. 12) verwendet. Das Programm ist nicht

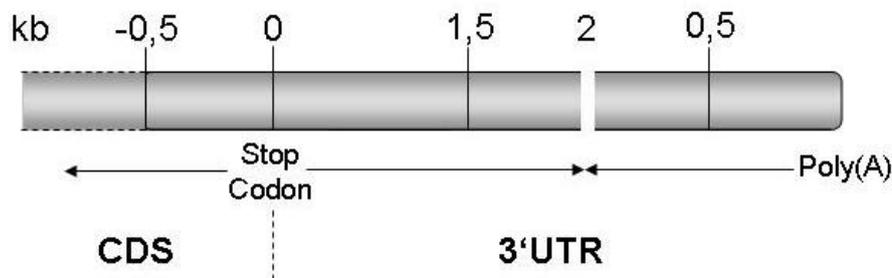
mehr auf eine *Cross*-Spezies Konservierung und die Bindung der miRNA an die 3'UTR beschränkt. Ein Problem der Analyse ist jedoch, dass die interessanten Zielsequenzen in das FASTA-Format konvertiert werden müssen und nur einzelne Zielgene abgefragt werden können. Daher wurde in unserem Labor das Programm *OTTO* geschrieben. In einer automatisierten Anfrage wird eine Liste potenzieller Zielgene analysiert. Das Programm extrahiert zunächst Daten zur mRNA Sequenz des Zielgens aus der *Entrez Gene* Datenbank, um wichtige Bestandteile, wie CDS und UTR zu speichern. Dann werden diese Daten in das RNA22 Programm eingelesen und analysiert. Am Ende der Auswertung errechnet das Programm die genaue Position der potenziellen miRNA Bindungsstelle. Diese Analyse beruht auf der Beobachtung, dass miRNAs an bestimmten Positionen der mRNA häufiger binden als an anderen [96]. Für die Analyse der Bindungsstellen wurden folgende Bereiche betrachtet: (i) die letzten 500 bp der CDS, (ii) die ersten 1500 bp der 3'UTR, (iii) die mittlere 3'UTR mit den Basenpaaren vom Stop-Kodon + 1500 bis 500 bp vor Ende der 3'UTR und (iv) die letzten 500 bp der 3'UTR (vgl. Abbildung in Tab. 3.12). Als Grundeinstellung für den RNA22 Algorithmus wurde ein *Mismatch* in einer *Seed*-Sequenz von 7 Nukleotiden erlaubt. Insgesamt müssen 14 Nukleotide bei einer maximalen Faltungsenergie für die Heteroduplex von -25 kcal/mol gepaart sein.

Die mittels TargetScan ermittelten potenziellen Zielgene wurden mithilfe des Programms *OTTO* im Detail untersucht. Dadurch wurde der Datensatz auf 20 Zielsequenzen reduziert. Diese wiesen Bindungsstellen nach den oben genannten Kriterien für die miR-100 in ihrer Sequenz auf. Tabelle 3.12 zeigt eine Übersicht der Lokalisation und freien Faltungsenergien dieser 20 ermittelten Zielgene. Es wurden 12 Zielgene mit Bindungsstellen in der 3'UTR gefunden. Für 6 Zielsequenzen lag diese am Anfang, für 2 am Ende und für 4 in der Mitte der 3'UTR. Drei potenzielle Zielgene zeigten Bindungsstellen für die miR-100 in ihrer CDS. Für die übrigen 5 Zielgene konnten ebenfalls Bindungsstellen für die miR-100 gefunden werden, diese lagen außerhalb der 3'UTR oder dem Ende der CDS. Da RNA22 potenzielle Bindungsstellen aufgrund von Faltungsenergien berechnet und eine komplette *Seed* Basenpaarung nicht mehr nötig ist, wurden die 3'UTR Bindungsstellen mithilfe des TargetScan Algorithmus oft nicht identifiziert.

Um einen genaueren Einblick in die Daten zu erhalten, wurden die Zielgene nach Ort der Bindungsstelle und der freien Faltungsenergie angeordnet. Bindungsstellen am Beginn der 3'UTR wurden stärker gewichtet als Bindungsstellen am Ende und in der Mitte der 3'UTR.

Tabelle 3.12.: Analyse der miRNA Bindungsstellen für die miR-100 mittels *OTTO*. Dargestellt ist die maximale Faltungsenergie für die Heteroduplex [kcal/mol]. Darunter ist eine schematische Darstellung der Lokalisation der Bindungsstellen.

Gen	Ende CDS	Start 3'UTR	Mittel 3'UTR	Ende 3'UTR	anders
CYP26B1		-30,7			-28,3
mTOR		-29,7			
RAVER2		-27,2			-28,6
ZBTB7A		-26,2			
PPP3CA		-26,1; -25,4			
MTMR3		-25,2	-28,4		-30,4
ZZEF1				-25,8	-25,4
BAZ2A				-25,2	-25,5
ADCY1			-26,8		
BMPR2			-25,8		-27,0; -26,2; -25,7
ICMT			-25,8		
FZD5			-25,5		
PPFIA3	-31,8				-29,2; -26,7
TRIB1	-29,0				
EIF2C2	-26,4				-25,0
FZD8					-28,5; -25,9; -25,7
FGFR3					-28,8; -26,8
PPP1CB					-25,5; -25,0
KBTD8					-26,5
CTDSPL					-25,2



Mit zwei potenziellen Bindungsstellen für die miR-100 und einer maximalen Faltungsenergie von -30,7 kcal/mol rangiert CYP26B1 an erster Position. Es ist ein Mitglied der Cytochrom P450 Familie. An zweiter Stelle befindet sich die Serin/Threonin Kinase mTOR. Eine weitere Serin/Threonin Kinase wurde mit BMPR2 identifiziert. Die Zink-Finger Proteine ZBTB7A und ZZEF1 weisen ebenfalls potenzielle Bindungsstellen für die miR-100 auf. Weitere potenzielle Bindungsstellen wurden in den *frizzeld homolog* Proteinen FZD5/8 detektiert. Diese Proteine kodieren für transmembrane Proteine, die als Rezeptoren des Wnt-Signalweges fungieren.

3.5.2. Analysen mittels GenMAPP2

Zur weiteren Betrachtung der Zielgene wurden diese mittels GenMAPP2 analysiert. Dazu wurden die Gene als *Expression Dataset* in die Software eingelesen und mittels MAPP-Finder2 analysiert. Grundlage für diese Analyse ist die Hypothese, dass miRNAs ganze Signalkaskaden regulieren [95]. Auf diesem Weg sollten weitere potenzielle Zielgene für die miRNA gefunden werden. Für eine erhöhte Stringenz wurden nur Gene mit Bindungsstellen in der 3'UTR oder CDS untersucht (vgl. Tab. 3.12). Mit dieser Analyse wurden 17

Tabelle 3.13.: Analyse der Signalwege, die potenzielle Zielgene der miR-100 beinhalten.

Signalweg (GenMAPP2 Kode)	Gene
G-Protein-Signaling	ADCY1; PPP3CA
Wnt-Signaling	FZD5; FZD8
mTOR-Pathway	mTOR
Alpha6-Beta4-Integrin NetPath	mTOR
Calcium regulation in cardiac cells	ADCY1
Smooth muscle contraction	ADCY1
Tissue-Endocrine and CNS	ADCY1
Ascorbate and aldarate metabolism	CYP26B1
Gamma Hexachlorocyclohexane degradation	CYP26B1
Flavonoids stilbene and lignin biosynthesis	CYP26B1
Purine metabolism	ADCY1
Adipogenesis	CYP26B1
IL-2 NetPath	mTOR
Insulin Signaling	mTOR
B Cell Receptor NetPath	PPP3CA
MAPK signaling pathway	PPP3CA
Fluorene degradation	CYP26B1

Signalkaskaden identifiziert, in denen sich die potenziellen Zielgene der miR-100 befinden. ADCY1 und PPP3CA sind Proteine des G-Protein Signalweges und weisen Bindungsstellen in der 3'UTR mit miR-100 auf. Im Wnt-Signalweg wurden FZD5 und FZD8 als Zielgene identifiziert. Diese weisen Bindungsstellen in der 3'UTR bzw. CDS auf. mTOR ist im PI3K/Akt/mTOR-Signalweg vertreten. In den übrigen Signalkaskaden konnte jeweils nur ein Zielgen der miR-100 identifiziert werden. Diese waren entweder mTOR, ADCY1, CYP26B1 oder PPP3CA.

3.5.3. Analyse der PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade

In den Fokus weiterführender Analysen rückte das Protein mTOR. Die geringe Faltungsenergie machte es zu einem interessanten Kandidatenzielgen. mTOR reguliert das Zell-

wachstum, die Zellproliferation und das Überleben der Zellen. Dadurch steht es im Zusammenhang mit verschiedenen malignen Erkrankungen (s. S. 22).

Für diese Analysen wurde der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg basierend auf der KEGG Datenbank verwendet. Im PI3K/Akt/mTOR-Signalweg sind 52 Proteine enthalten. Diese wurden extrahiert und die entsprechende mRNA mithilfe des Programms *OTTO* auf Bindungsstellen für die miR-100 in ihrer 3'UTR untersucht. Dieses Kriterium wurde gewählt, um die Stringenz der Analysen zu erhöhen. Bindungen von miRNAs an die CDS der Zielgene sind zwar bekannt, jedoch selten. Gerade für tierische Zellen ist die Bindung der miRNA an die 3'UTR am häufigsten charakterisiert. Die Einstellungen für die Analysen wurden wie in Kapitel 3.5.1 gewählt.

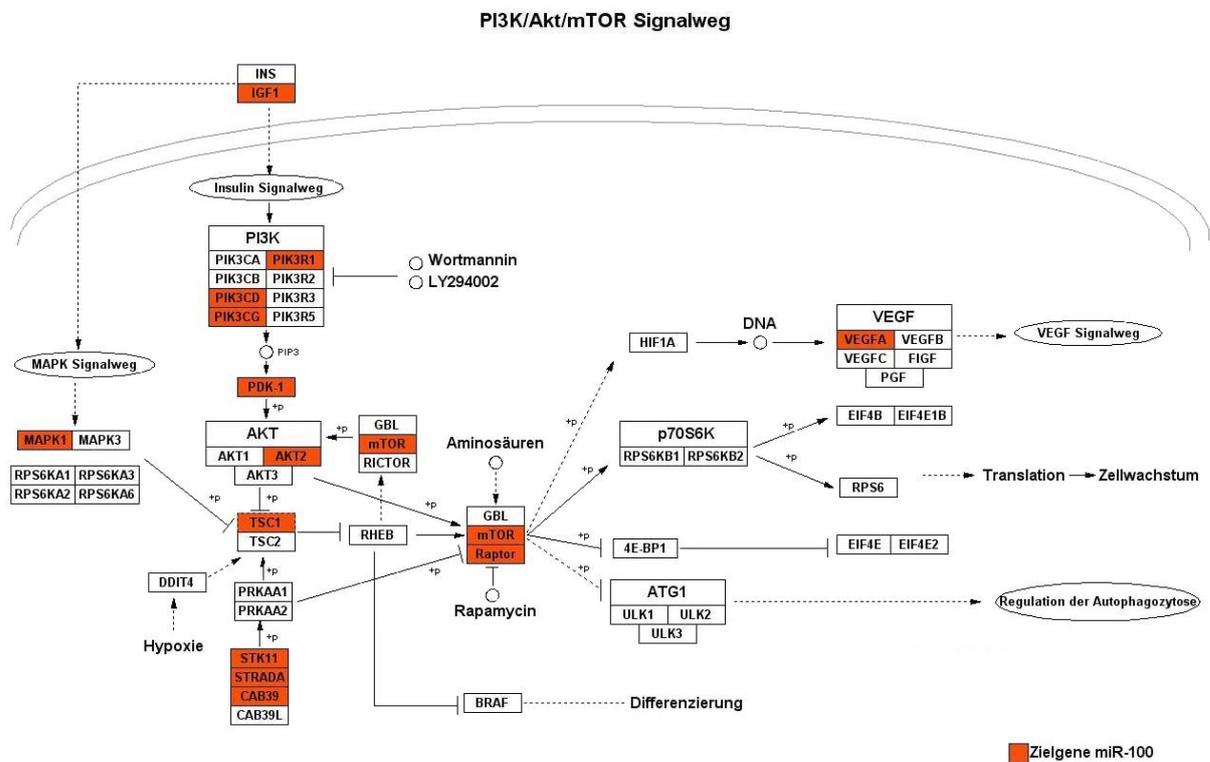


Abbildung 3.4.: Die PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade. In rot sind die potenziellen Zielgene der miR-100 dargestellt. Diese besitzen in ihrer 3'UTR Bindungsstellen für die miRNA mit einer maximalen Faltungsenthalpie von -25 kcal/mol.

Von den im PI3K/Akt/mTOR-Signalweg hinterlegten Genen weisen 15 Gene potenzielle Bindungsstellen für die miR-100 in ihrer 3'UTR auf. Dies entspricht etwa 29% der im Signalweg hinterlegten Proteine. Die Zielgene verteilen sich über den gesamten Si-

gnalweg. Die katalytischen p110 δ / γ sowie die regulatorische Untereinheit p85 α der PI3K enthalten jeweils Bindungsstellen für die miR-100. P110 δ enthält zwei Bindungsstellen mit Faltungsenergien von -25,2 kcal/mol und -27,6 kcal/mol. Für die p110 γ Untereinheit wurde eine Faltungsenergie von -27,5 kcal/mol und für die p85 α regulatorische Einheit eine Faltungsenergie von -28,3 kcal/mol errechnet. PDK-1 wurde ebenfalls als potenzielles Zielgen der miR-100 identifiziert. Die Phosphoinositid-abhängige Protein Kinase 1 hat eine zentrale Rolle im Signalweg, und ist für eine Aktivierung von Akt notwendig. Die Faltungsenergie der 3'UTR mit der miR-100 beträgt -25,7 kcal/mol. Akt2 ist ein Mitglied der Akt-Familie. Für dieses Protein, bzw. die entsprechende mRNA konnte eine potenzielle Bindungsstelle für die miR-100 identifiziert werden. Diese weist eine Faltungsenergie von -26,3 kcal/mol auf und erstreckt sich ohne *Mismatch* über die gesamte *Seed*-Sequenz, bzw. die Basen 1-10 der miRNA. Ebenfalls eine vollständige *Seed*-Bindung mit der miR-100 zeigt mTOR (vgl. Abb. 3.5). G:U Wobbel Basenpaarungen werden in dieser Sequenz

mTOR	5' CATAACTTTAGAAATACGGGT 3'
miR-100	3' GUGUUCAAGCCUAG AUGCCCAA 5'

Abbildung 3.5.: Bindung der miR-100 an die 3'UTR von mTOR. Die *Seed*-Sequenz der miRNA ist hervorgehoben.

nicht detektiert und die maximale Faltungsenergie beträgt -29,7 kcal/mol (s. Anhang Abb. 5.4, S. 135). Ein weiteres potenzielles Zielgen der miR-100 ist Raptor, ein Protein welches zusammen mit mTOR im mTORC1 Komplex vorliegt. Für Raptor wurden in der 3'UTR zwei Bindungsstellen für die miR-100 gefunden. Diese besitzen Faltungsenergien von -25,5 kcal/mol sowie -26,2 kcal/mol und überlappen sich. Ein Inhibitor von mTOR, der Tuberin/Hamartin Komplex zeigt ebenfalls potenzielle Bindungsstellen für die miRNA. TSC1 ist ein Bestandteil dieses Komplexes und besitzt zwei Bindungsstellen in der 3'UTR mit einer Faltungsenergie von -28,7 kcal/mol bzw. -31,4 kcal/mol. Eine vollständige Übersicht der potenziellen Zielgene der miR-100 im PI3K/Akt/mTOR-Signalweg gibt die Abb. 3.4.

Neben dem PI3K/Akt/mTOR-Signalweg wurden noch weitere Signalkaskaden auf Anhäufungen von potenziellen miR-100 Zielgenen analysiert. Der Wnt-Signalweg beinhaltet 72 Mediatoren, von denen neun potenzielle Bindungsstellen in ihrer 3'UTR mit der miR-100 aufweisen. Eine Analyse weiterer Signalkaskaden zeigte durchschnittlich in etwa 11%

der Proteine einer Signalkaskade potenzielle Bindungsstellen für die miR-100. Dieser Wert liegt deutlich unter der Anzahl potenzieller Zielgene im PI3K/Akt/mTOR-Signalweg.

3.6. Transduktionseffizienzen

In den folgenden Experimenten sollte der Einfluss der miR-100 auf leukämische Zellen näher untersucht werden. Da die miRNA in Patienten mit AML Translokation (8;21) im Vergleich zu PB-MNCs stark reduziert ist, wurde die miR-100 lentiviral überexprimiert. Durch diese Veränderung der miRNA Expression kann man die Effekte, die diese miRNA auf die Zelle ausübt, untersuchen. Eine Veränderung des miRNA Gehaltes in der Zelle kann Signalkaskaden, und somit das Verhalten der Zellen beeinflussen.

Um eine reife miRNA überexprimieren zu können, wurde eine pre-miRNA mithilfe lentiviraler Vektoren in die Zellen eingebracht und von diesen prozessiert. Daher wurde zunächst die pre-miR-100 in den lentiviralen Vektor SIEW kloniert (s. S. 48). Nach lentiviraler Transduktion der Zielzellen und stabiler Integration in das Genom der Zellen, wird die reife miRNA prozessiert. Durch diese Methode erreicht man eine verstärkte Expression einzelner miRNAs.

Als Zellkulturmodell für die AML mit Translokation (8;21) wurde die Zelllinie Kasumi-1 verwendet. Diese Zelllinie wurde aus dem peripheren Blut eines 7-jährigen Jungen mit einer AML (M2) etabliert. Sie enthält das Fusionsprotein AML1/ETO. Als weiteres leukämisches Zellkulturmodell wurde die Zelllinie K562 für einige Experimente verwendet. Diese Zelllinie wurde aus einer 53-jährigen Frau mit chronischer myeloischer Leukämie (Ph+) isoliert. Weiterhin wurde die U937 Zelllinie als Kontrollzelllinie für erste Experimente verwendet. Diese Zellen wurden aus dem Pleuraerguss eines 37-jährigen Mannes mit einem diffusen histiozytären Lymphom isoliert.

32D ist eine IL3-abhängige, murine Knochenmarkzelllinie, die aus C3H/HeJ Mäusen isoliert wurde. 32D Δ trkA ist eine IL3-unabhängige Form dieser Zelllinie, die eine modifizierte Form des *Tropomyosin-related Kinase* Rezeptor (TRKA) exprimiert. Diese Zelllinie zeichnet sich durch einen konstitutiv aktivierten mTOR-Signalweg aus. Als Kontrollzelllinie zur 32D Δ trkA diente die Zelllinie 32D-ctrl, die mit einem CD34-Vektor transduziert wurde.

Die Transduktion wurde für alle Zelllinien mit einer MOI von etwa 2 durchgeführt (vgl. S. 60). Es wurden jeweils S-miR-100-IEW und ein Kontrollkonstrukt (SIEW oder S-miR-

ctrl-IEW) transduziert. Diese Vektoren beinhalten das *gfp* Gen, wodurch sich die Transduktionseffizienz leicht mittels FACS Analysen überprüfen lässt. Man erhielt etwa 99% GFP-positive Zellen. Für alle Experimente wurden die Effekte der miR-100 im Vergleich zu den Kontrollkonstrukten bestimmt.

In Kasumi-1 Zellen erreichte man nach Transduktion mit S-miR-100-IEW eine mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) von 550. Für das Kontrollkonstrukt wurde eine MFI von 700 erreicht. In den Experimenten konnte durchschnittlich eine 15-fache Überexpression der miR-100 erzielt werden. Je nach Viruspräparation bewegte sich die Überexpression zwischen einem *Fold Change* von 15 bis 30. Die erhöhte Expression der miR-100 in diesen Zellen blieb stabil.

K562 Zellen nehmen den Virus bei Transduktion wesentlich leichter auf, als Kasumi-1 Zellen. Die MFI in diesen Zellen betrug etwa 1500 für S-miR-100-IEW und die Kontrollkonstrukte. Die miR-100 konnte dadurch etwa 250-fach überexprimiert werden. U937 Zellen verhielten sich nach Transduktion wie K562 Zellen. Durchschnittlich konnte die miR-100 50-fach überexprimiert werden.

32D Δ trkA und 32D-ctrl wurden ohne Spinokulation transduziert, da diese Zellen sehr sensitiv auf die virale Transduktion reagierten. Bei mindestens 98% GFP-positiver Zellen, wurde in diesen Zellen eine MFI von etwa 700 für Kontroll-transduzierte, bzw. von 500 für miR-100 transduzierte Zellen gemessen. Die miR-100 konnte in diesen Zellen weit über 2000-fach überexprimiert werden.

3.7. Valdierung der miR-100 Zielgene

3.7.1. Western Blot Analysen

In tierischen Zellen regulieren miRNAs ihre Zielgenen durch Inhibierung der Translation. Durch die Bindung der miRNA an die Zielsequenzen kommt es zur Blockade der Translation und somit zu einer reduzierten Proteinexpression. In diesem Prozess wird die mRNA nicht degradiert. Um Interaktionen einer miRNA mit einer Zielsequenz nachzuweisen ist es daher notwendig, Expressionsunterschiede auf Proteinebene zu untersuchen. Eine Methode ist die Analyse des Proteingehalts mittels Western Blot. Dazu wird die entsprechende miRNA in Zellen überexprimiert. Durch die erhöhte Expression der miRNA kommt es

zur vermehrten Inhibierung der Translation entsprechender Zielsequenzen. Die Reduktion potenzieller Ziel-Proteine kann so nachgewiesen werden.

Zur Validierung einiger vorhergesagter Zielgene wurden Kasumi-1 und K562 Zellen genutzt. In diesen Zellen wurde die miR-100 lentiviral überexprimiert. Als Kontrolle wurden entsprechende Kontroll-Vektoren verwendet. Die Effizienz der Transduktion wurde nach 4 Tagen mittels FACS gemessen (s. S. 97). Am Tag 5 nach der Transduktion wurden die Proteinlysate gewonnen und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die erhöhte Expression der miRNA sollte in einer reduzierten Expression entsprechender Ziel-Proteine resultieren. Als Ladekontrolle für den Western Blot wurde entweder β -Actin oder SNF2H genutzt. SNF2H besitzt laut TargetScan ebenfalls eine Bindungsstelle für die miR-100. Dies wurde in ersten Experimenten mittels Western Blot untersucht und konnte nicht bestätigt werden. Vielmehr stellte sich heraus, dass dieses Protein unter allen Bedingungen in unverändertem Maß vorliegt. Mithilfe einer RNA22 Analyse dieses Proteins konnten ebenfalls keine Bindungsstellen festgestellt werden. Für die Auswertung der Daten wurden die Proteinexpressionen entweder auf die Expression von β -Actin oder SNF2H normalisiert. Die Expression des zu untersuchenden Proteins wurde für Wildtypzellen zu 100% kalkuliert. Die Proteinexpression in miR-100 oder Kontroll-transduzierten Zellen wurde im Verhältnis dazu errechnet.

Zunächst wurden die Effekte einer Überexpression von miR-100 auf die Expression von mTOR analysiert. Mit $-29,7$ kcal/mol besitzt diese potenzielle Bindungsstelle eine sehr günstige energetische Verteilung. Daher wurde erwartet, dass dieses Protein nach Überexpression der miRNA reduziert in den Zellen vorliegt. Die Überexpression der miR-100 in Kasumi-1 Zellen resultierte in einer Reduktion von mTOR um durchschnittlich 48,5% im Vergleich zu Wildtypzellen. Für Kontroll-transduzierte Zellen wurde eine Reduktion des Protein von 14,5% im Vergleich zu Wildtypzellen gemessen. In K562 Zellen wurden keine Unterschiede in der Expression von mTOR in Wildtyp- und Kontrollzellen festgestellt. Eine Überexpression der miR-100 in diesen Zellen resultierte in einer um etwa 36% verringerten Expression des Proteins. Für diese Analysen wurden jeweils die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten kalkuliert (s. Abb. 3.6a).

Als nächstes potenzielles Zielgen wurde Raptor analysiert. Dieses Protein bildet zusammen mit mTOR und weiteren Proteinen den regulatorischen mTORC1-Komplex. Die 3'UTR von Raptor weist zwei potenzielle Bindungsstellen für die miR-100 auf. Die Faltungsenthalpie dieser Bindungsstellen ist geringer als die von mTOR und beträgt durchschnittlich $-25,8$ kcal/mol.

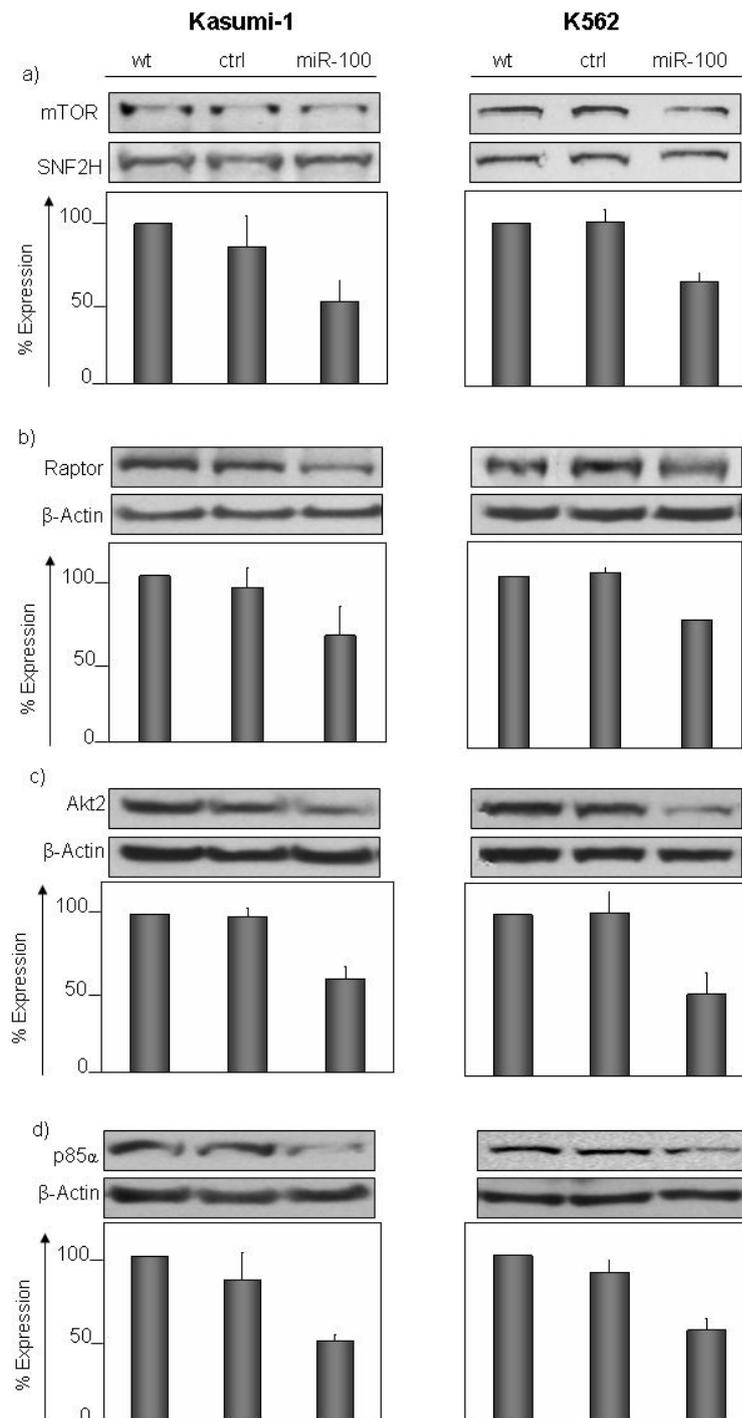


Abbildung 3.6.: Ergebnisse der Western Blot Analysen. Die miR-100 wurde in Kasumi-1 und K562 Zellen lentiviral überexprimiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment. Zur Quantifizierung wurden 2, bzw. 3 unabhängige Experimente analysiert. a) mTOR ist um ca. 40-50%, b) Raptor ist um ca. 25-35%, c) Akt2 ist um ca. 40-50% und d) p85α ist um 45-50% in Zellen nach miR-100 Überexpression reduziert.

Weiterhin wurden für beide Bindungsstellen *Mismatches* in der *Seed*-Sequenz identifiziert. Zur Validierung von Raptor als Zielsequenz für die miR-100 wurden jeweils zwei repräsentative Experimente herangezogen. Die Überexpression der miR-100 resultierte in einer Reduktion von Raptor um durchschnittlich 36% für Kasumi-1 Zellen und um etwa 26% für K562 Zellen. Trotz der Vielzahl der Bindungsstellen in der 3'UTR von Raptor liegt eine geringere Reduktion des Proteins nach Überexpression der miR-100 vor. Die Transduktion der Zellen mit einem Kontroll-Vektor zeigte keine bis geringe Effekte auf die Proteinexpression (2-6% Unterschied zu Wildtypzellen) (s. Abb. 3.6b).

Eine Überexpression der miR-100 in leukämischen Zellen resultiert somit in einer Reduktion zweier essentieller Proteine des mTORC1 Komplexes. MLST8 ist ein weiterer Bestandteil dieses Komplexes und weist eine potenzielle Bindungsstelle für die miR-100 in der CDS auf. Für die weiteren Bestandteile des Komplexes, PRAS40 und DEPTOR, konnten mithilfe des Programms *OTTO* keine potenziellen Bindungsstellen für die miR-100 identifiziert werden. Daher wurden diese Proteine nicht mittels Western Blot analysiert.

Upstream des mTORC1-Komplexes befinden sich PI3K und Akt. In der Familie der Akt Proteine wurde für Akt2 eine potenzielle Bindungsstelle für die miR-100 in der 3'UTR gefunden. Diese Bindungsstelle ist *Mismatch*-frei bei einer Faltungsenthalpie von -26,3 kcal/mol. In Kasumi-1 Zellen wurde nach Überexpression der miR-100 eine durchschnittliche Reduktion von Akt2 um 40% in drei unabhängigen Experimenten gemessen. Für K562 Zellen wurden zwei Experimente durchgeführt. In diesen wurden eine um etwa 50% reduzierte Expression des Proteins detektiert. Für die Kontrollzellen wurde, im Vergleich zu Wildtypzellen, keine Veränderung der Proteinexpression gemessen (s. Abb. 3.6c).

Für die p85 α Untereinheit der PI3K konnte eine potenzielle Bindungsstelle für die miR-100 in der 3'UTR gefunden werden. Diese zeigte eine maximale Faltungsenthalpie von -28,3 kcal/mol. Für Kasumi-1 und K562 Zellen wurden jeweils zwei Experimente durchgeführt. Nach lentiviraler Überexpression der miR-100 in diesen Zellen konnte für Kasumi-1 Zellen eine Reduktion von p85 α um über 50%, für K562 Zellen um 45% im Vergleich zu Wildtypzellen gemessen werden. In beiden Fällen wurde für Kontroll-transduzierte Zellen eine Reduktion von p85 α um etwa 10% gemessen (s. Abb. 3.6d).

Neben p85 α zeigte die katalytische Untereinheit p110 δ der PI3K zwei potenzielle Bindungsstellen in der 3'UTR für die miR-100. Bei Faltungsenthalpien von -25,2 kcal/mol und -27,6 kcal/mol wurden *Mismatches* und *Bulges* in der Bindung identifiziert. In K562 Zellen konnte p110 δ nicht mittels Western Blot detektiert werden. Eine Überexpression der miR-100 in Kasumi-1 Zellen zeigte keine Reduktion der p110 δ Untereinheit. In

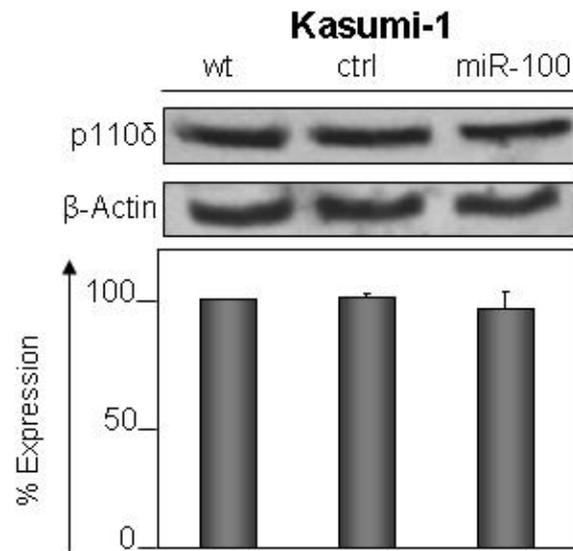


Abbildung 3.7.: p110 δ konnte nur in Kasumi-1 Zellen detektiert werden. Eine Regulation des Proteins nach Überexpression der miR-100 wurde nicht detektiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot, zur Quantifizierung wurden 2 unabhängige Experimente genutzt.

zwei unabhängigen Experimenten betrug die Expression in Kontroll-transduzierten, miR-100-überexprimierenden und Wildtypzellen 100% (s. Abb. 3.7). Diese PI3K Untereinheit konnte somit nicht als potenzielles Zielgen der miRNA bestätigt werden.

Neben dem mTORC1 spielt der mTORC2-Komplex im PI3K/Akt/mTOR-Signalweg eine entscheidende Rolle. mTORC2 ist durch die Phosphorylierung von Akt an Ser473 für die vollständige Aktivierung dieses Proteins essentiell. Im Gegensatz zu mTORC1 beinhaltet mTORC2 das Protein Rictor. Raptor ist in diesem Komplex nicht vorhanden. Dadurch ist dieser Komplex Rapamycin-insensitiv (vgl. Kapitel 1.5.3, S. 23). Für Rictor wurden mithilfe des Programms *OTTO* keine Bindungsstellen für die miR-100 identifiziert. Daher wurde keine Reduktion des Proteins nach Überexpression der miRNA erwartet. Dies konnte in jeweils zwei Experimenten für Kasumi-1 und K562 Zellen bestätigt werden (s. Abb. 3.8). Die Expression von Rictor schwankte für miR-100 und Kontroll-transduzierte Zellen zwischen 90 und 120% im Vergleich zu Wildtypzellen.

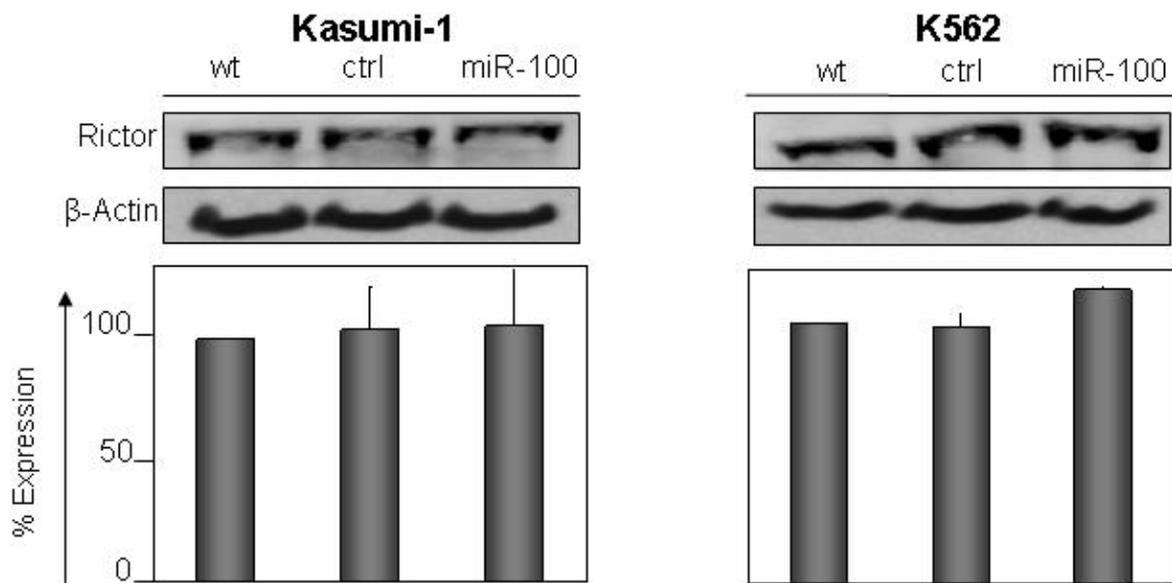


Abbildung 3.8.: Rictor ist Teil des mTORC2-Komplexes und weist keine potenziellen Bindungsstellen für die miR-100 in der 3'UTR auf. In der Western Blot Analyse konnte keine Reduktion des Proteins nach Überexpression der miR-100 in Kasumi-1 und K562 Zellen gezeigt werden. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot. Zur Quantifizierung wurden jeweils 2 Experimente genutzt.

3.7.2. Luziferase Assay

Eine weitere Methode zur Validierung von miRNA Zielgenen sind Reportergeren Assays. In dieser Arbeit wurden für diese Analysen Luziferase Assays verwendet. Hierzu wurden die entsprechenden Zielsequenzen in die 3'-Region der *Renilla* Luziferase des Vektors psiCHECK-2 kloniert. Dieses Konstrukt wurde zusammen mit der miRNA in Zellen transfiziert. Nach der Prozessierung bindet die miRNA an die Zielsequenz im psiCHECK-2 Vektor. Dies führt zur Degradation der *Renilla* Luziferase und somit zu einer reduzierten Aktivität. Mit dieser Methode lassen sich direkte Interaktionen zwischen Zielsequenzen und miRNAs nachweisen. Für die Versuche wurde entweder die Zielsequenz von mTOR mRNA, oder die beiden sich überlappenden Zielsequenzen der raptor mRNA in den Vektor psiCHECK-2 kloniert. 293 Zellen wurden mit den entsprechenden Vektoren lipofiziert (s. S. 62). Das Luziferase Assay wurde 24 h nach Lipofektion durchgeführt. Zur Auswertung wurden drei repräsentative Experimente herangezogen und die statistische Signifikanz mithilfe eines t-Tests analysiert. Die Reduktion der *Renilla* Luziferase durch die miRNA wurde im Vergleich zum Kontroll-Vektor bestimmt.

Bei einer Ko-Transfektion der miR-100 und psiCHECK-2-mTOR in 293 Zellen, wurde

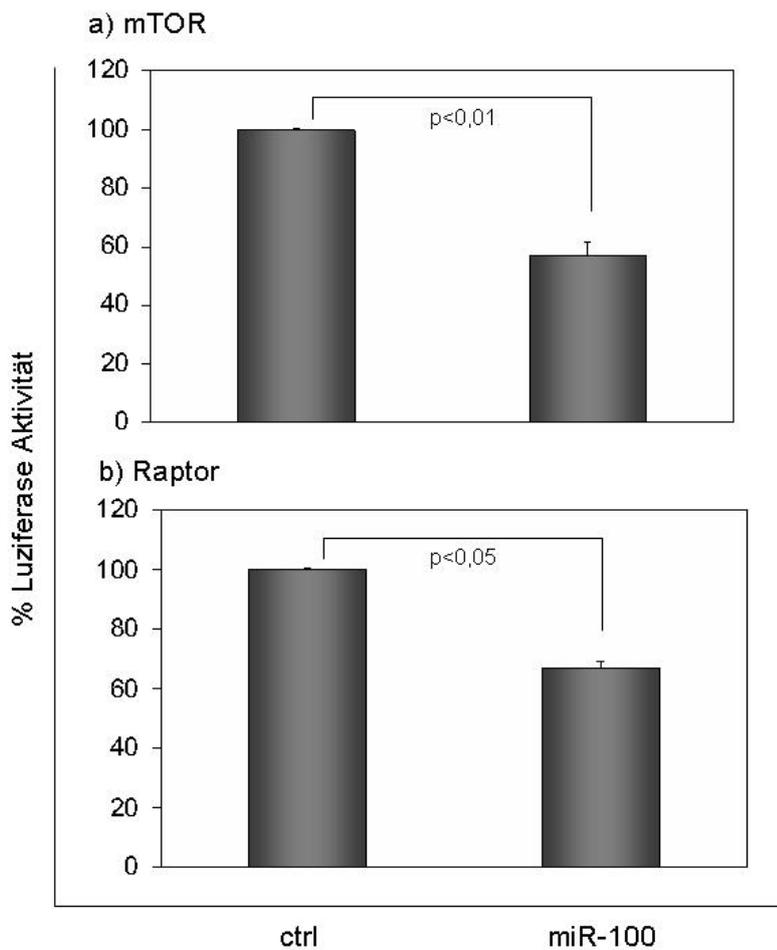


Abbildung 3.9.: Ergebnis des Luziferase Assays. a) miR-100 reduziert die Luziferase Aktivität durch Bindung an die mTOR Zielsequenz im psiCHECK-2 Vektor um etwa 43%, b) durch Bindung an die Raptor Zielsequenz wurde die *Renilla* Luziferase Aktivität um 33% verringert.

im Luziferase Assay eine durchschnittliche Reduktion der *Renilla* Luziferase Aktivität von etwa 43% beobachtet. Dieses Ergebnis ist hochsignifikant und spricht somit für eine direkte Interaktion der miR-100 mit der entsprechenden Zielsequenz in der 3'UTR von mTOR. Eine direkte Interaktion wurde ebenfalls für Zielsequenz in der raptor mRNA nachgewiesen. Die miR-100 inhibiert in diesem Fall die Luziferase Aktivität um über 30% im Vergleich zum Kontroll-Vektor. Trotz der doppelten Bindungsstellen für die miRNA in der raptor mRNA, konnte in keinem Experiment eine höhere Reduktion der Luziferase Aktivität, als für die mTOR Zielsequenz gemessen werden.

3.7.3. mRNA Expression nach miR-100 Überexpression

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass eine Überexpression der miR-100 in einer reduzierten Proteinexpression von mTOR, Raptor, Akt2 und p85 α resultiert. Weiterhin konnte die direkte Interaktion der miRNA mit den entsprechenden Zielsequenzen der 3'UTR von mTOR und raptor mRNA nachgewiesen werden. Die Reduktion der Proteine in tierischen Zellen lässt sich oft auf eine Unterdrückung der Translation zurückführen. Dabei verbleibt die mRNA in der Zelle, wird jedoch nicht mehr translatiert. Die Degradation der mRNA durch den miRNA-RISC Komplex wird in tierischen Zellen selten beobachtet.

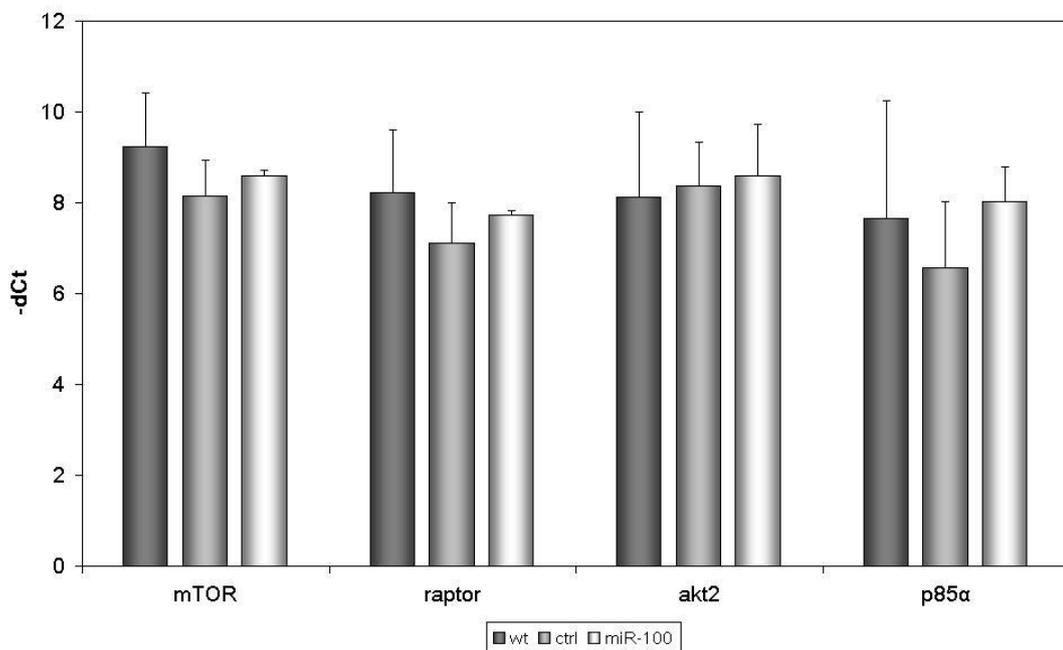


Abbildung 3.10.: Ergebnis der RT-PCR. Signifikante Unterschiede in der Expression von mTOR, raptor, akt2 und p85 α mRNA wurden in Kasumi-1 bei einer miR-100 Überexpression nicht festgestellt. $-\Delta\text{Ct}$ reflektiert die relative Expression.

Mithilfe der RT-PCR kann man dieses Phänomen untersuchen. Dazu wurde RNA transduzierter Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mithilfe spezifischer Primer für mTOR, raptor, akt2 und p85 α mRNA wurde dann in einer *real-time* PCR die mRNA relativ zur gapdh mRNA quantifiziert. Als relative Expression kann der ΔCt Wert angesehen werden. Zur besseren graphischen Darstellung wurde der $-\Delta\text{Ct}$ Wert errechnet. Abbildung 3.10 zeigt die Ergebnisse der RT-PCR für die mTOR, raptor, akt2 und p85 α

mRNA. Für die vier Zielgene der miR-100 wurden in Wildtyp-, Kontrollzellen und miR-100 transduzierten Zellen keine signifikanten Unterschiede in der Expression der mRNA festgestellt. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Somit kann man eine Degradation der mRNA Zielsequenzen durch die Wirkung der miR-100 ausschließen.

3.8. Effekte der miR-100 auf verschiedene Zelllinien

Nachdem vier Proteine des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges als Zielgene der miR-100 vorhergesagt und bestätigt wurden, sollten die Effekte, die die miRNA auf Zellen ausübt näher untersucht werden. Dazu wurden die entsprechenden Zellen wie in Kapitel 3.6 beschrieben lentiviral mit miR-100 oder entsprechenden Kontroll-Vektoren transduziert. Dadurch kann man eine stabil erhöhte Expression der miRNA über einen langen Zeitraum erreichen.

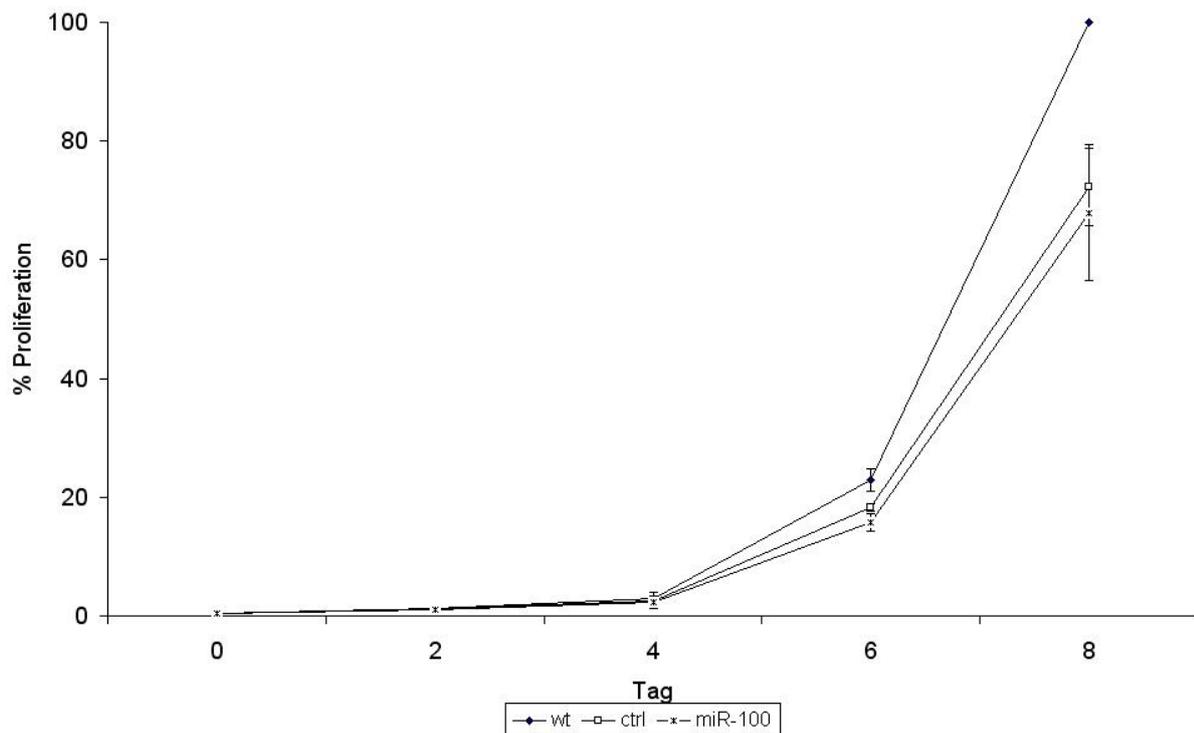


Abbildung 3.11.: Proliferationsverhalten von U937 Zellen nach Transduktion mit Kontroll bzw. pre-miR-100 Virusüberstand. Die Überexpression der miR-100 zeigte keinen Effekt auf die Zellproliferation. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Experimenten.

Zunächst wurden die Effekte der miR-100 auf U937 Zellen untersucht. Morphologisch

konnten in diesen Zellen keine Veränderungen nach lentiviraler Transduktion festgestellt werden. Zur Analyse der Zellproliferation wurde die Zellzahl über einen Zeitraum von 8 Tagen mittels Trypanblau Ausschluß bestimmt. Abb. 3.11 zeigt repräsentativ das Proliferationsverhalten von U937 Zellen nach Transduktion. Die Proliferation der Wildtypzellen wurde zu 100% normalisiert. Die erhöhte Expression der miR-100 in diesen Zellen zeigte keine Effekte auf die Zellproliferation im Vergleich zu Kontroll-transduzierten Zellen.

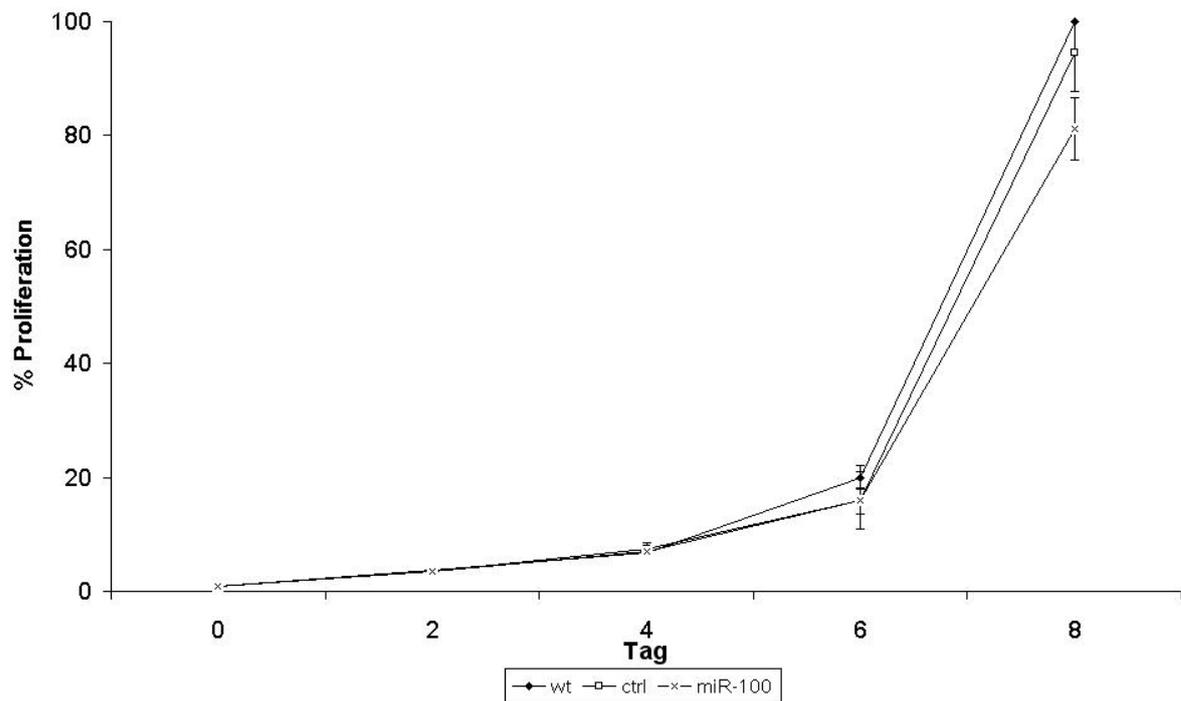


Abbildung 3.12.: Proliferationsverhalten von K562 Zellen nach Transduktion mit Kontroll bzw. pre-miR-100 Virusüberstand. Eine erhöhte miR-100 Expression verminderte die Zellproliferation um etwa 10% im Vergleich zu Kontrollzellen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Experimenten.

Weiterhin wurden K562 Zellen auf ihre Reaktion gegenüber einer erhöhten Expression der miR-100 getestet. In diesen Zellen konnte die miRNA sehr stark überexprimiert werden (etwa 250-fach). In Abb. 3.12 ist das Proliferationsverhalten von K562 Zellen nach lentiviraler Transduktion mit Kontroll-, bzw. pre-miR-100 Virusüberstand gezeigt. Im Vergleich zu Kontrollzellen wurde für eine Überexpression der miR-100 in diesen Zellen eine minimal verminderte Zellproliferation festgestellt.

Eine Transduktion der t(8;21) positiven Zelllinie Kasumi-1 mit der miR-100 zeigte ein

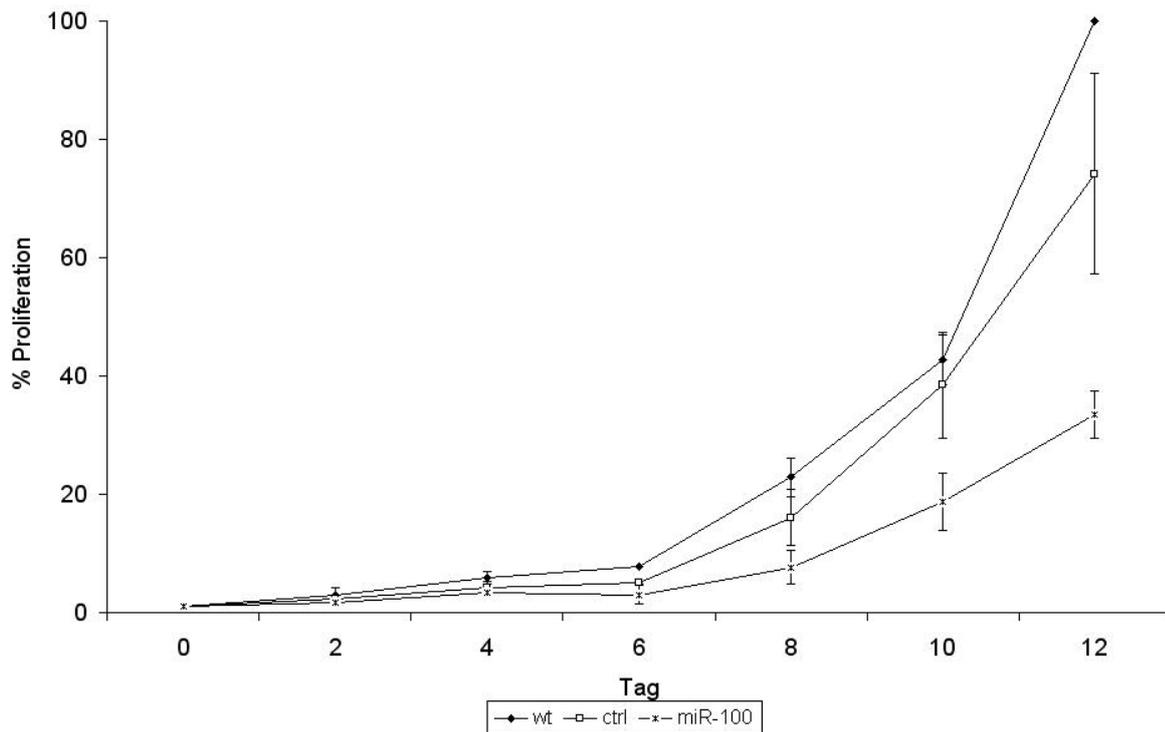


Abbildung 3.13.: Proliferationsverhalten von Kasumi-1 Zellen nach Transduktion mit Kontroll bzw. pre-miR-100 Virusüberstand. Die Überexpression der miR-100 resultierte in einer Proliferationshemmung um 55% im Vergleich zu Kontrollzellen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Experimenten.

anderes Ergebnis. Nach lentiviraler Transduktion der Zellen mit der pre-miR-100 wurde eine etwa 15 bis 30-fach erhöhte Expression der miR-100 in den Zellen detektiert. Weiterhin verminderte sich die Proliferation dieser Zellen um etwa 55% im Vergleich zu Kontrollzellen (vgl. Abb. 3.13).

Als weiteres Leukämie Modell wurden die Zelllinien 32D-ctrl und 32D Δ trkA verwendet. Die Überexpression der miR-100 in der 32D-ctrl Zelllinie zeigte geringere Effekte als bei Kasumi-1 Zellen. Die Proliferation nach Überexpression verminderte sich um etwa 35% (vgl. Abb. 3.14).

32D Δ trkA zeichnen sich durch einen konstitutiv aktivierten mTOR-Signalweg aus. Diese Zellen reagieren daher äußerst sensitiv auf eine Hemmung dieses Signalweges. Dies wurde ebenfalls nach einer verstärkten Expression der miR-100 (etwa 2000-fach) beobachtet. Eine lentivirale Überexpression der miR-100 in diesen Zellen zeigte eine Verminderung der Proliferation um etwa 70% im Vergleich zu Kontrollzellen (vgl. Abb. 3.15).

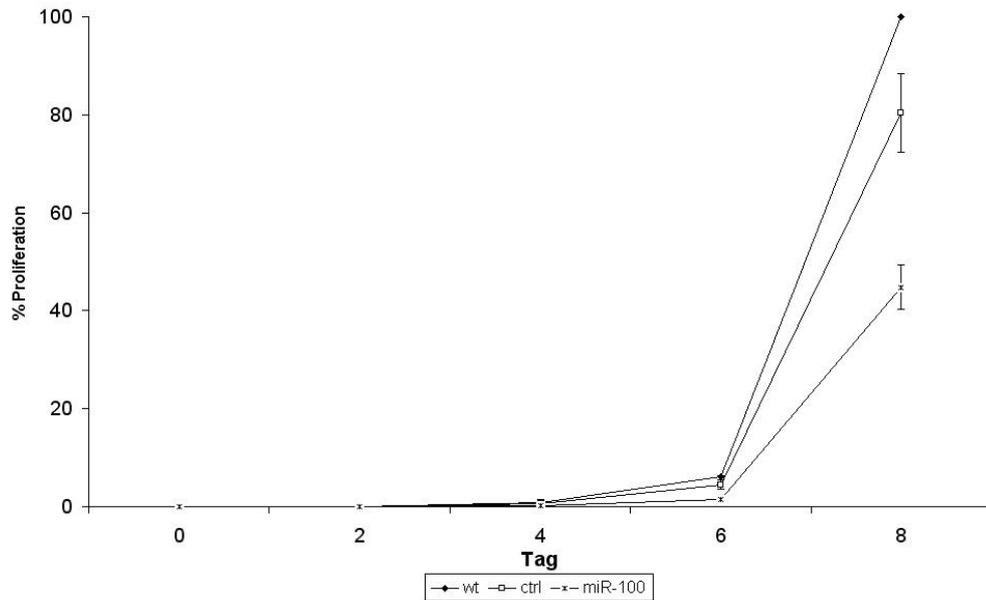


Abbildung 3.14.: Proliferationsverhalten von 32D-ctrl Zellen nach Transduktion mit Kontroll bzw. pre-miR-100 Virusüberstand. Die Überexpression der miR-100 resultierte in einer Proliferationshemmung von etwa 35% im Vergleich zu Kontrollzellen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Experimenten

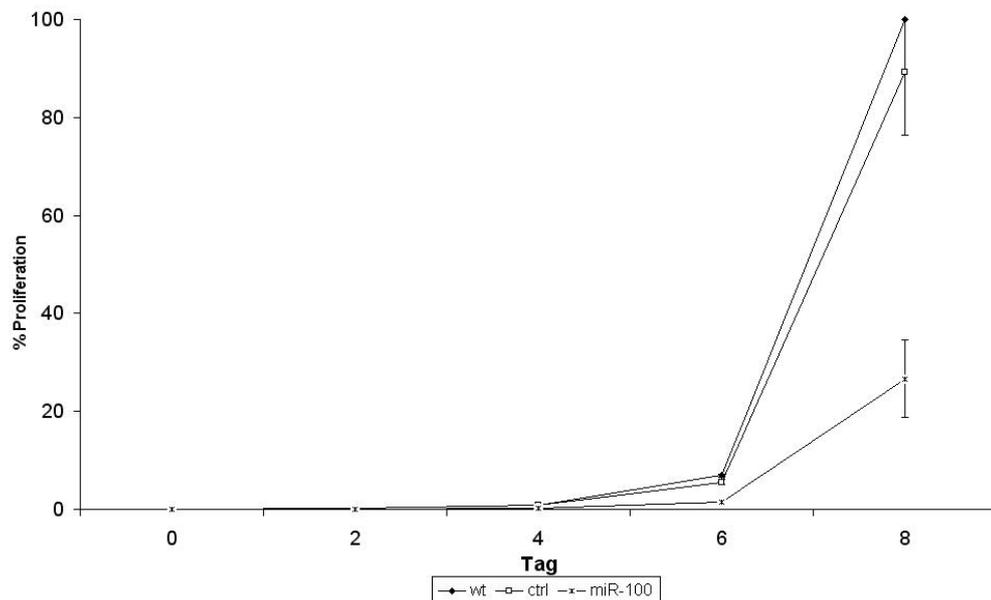


Abbildung 3.15.: Proliferationsverhalten von 32D Δ trkA Zellen nach Transduktion mit Kontroll bzw. pre-miR-100 Virusüberstand. Die Überexpression der miR-100 resultiert in einer starken Proliferationshemmung von über 70% im Vergleich zu Kontrollzellen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Experimenten

3.9. Effekte von Rapamycin

mTOR und Raptor wurden in den vorangegangenen Experimenten als Zielgene der miR-100 validiert. Es stellt sich daher die Frage, inwieweit diese miRNA die Effekte von Rapamycin auf die Zellen beeinflusst. Rapamycin ist ein selektiver Inhibitor von mTORC1. Der mTORC2-Komplex ist nicht zugänglich für die Wirkung dieses Makrolid-Antibiotikums.

Für die weiteren Experimente wurden daher verschiedene Zelllinien auf ihre Sensitivität gegenüber Rapamycin getestet. In der Literatur wird für U937 und K562 eine Insensitivität gegenüber dem Medikament beschrieben [97]. Neben diesen beiden Zelllinien wurden ebenfalls Kasumi-1 Zellen verwendet. Weiterhin wurden 32D Δ trkA Zellen genutzt. Diese murinen, hämatopoetischen Zellen sollten sensitiv auf Rapamycin reagieren [68]. Entsprechende Kontrollzellen wurden ebenfalls getestet.

Tabelle 3.14.: Rapamycin Sensitivität verschiedener Zelllinien. U937 und K562 Zellen sind Rapamycin insensitiv. Kasumi-1 und 32D-ctrl Zellen zeigten moderate Effekte nach Behandlung mit Rapamycin. 32D Δ trkA sind Rapamycin sensitiv. % vitale Zellen 24 h nach Behandlung.

% Vital nM Rapa	U937		K562		Kasumi-1		32D-ctrl		32D Δ trkA	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Wildtyp	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
DMSO	98,6	2,0	97,9	11,8	104,6	1,8	94,1	6,4	100,3	13,1
12	97,9	3,0	94,6	1,3	88,4	2,5	85,5	13,6	48,9	6,7
25	99,3	1,0	104,0	12,0	93,0	4,3	84,3	3,9	48,5	3,3
50	103,3	2,7	97,0	4,2	93,3	9,4	84,8	10,0	45,0	3,9
100	97,9	3,0	96,4	13,9	85,5	1,7	89,3	8,4	45,5	1,0

Um die Sensitivität der verschiedenen Zelllinien gegenüber Rapamycin zu untersuchen, wurden diese mit verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums inkubiert. In einem Kontrollansatz wurde DMSO zu den Zellen gegeben. Die Vitalität der Zellen wurde mittels Trypanblau Ausschluß analysiert. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und die Mittelwerte, sowie Standardabweichungen bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 3.14 dargestellt.

Wie erwartet zeigten die Zelllinien U937 und K562 keine Reaktion auf die Behandlung mit Rapamycin. Der Anteil vitaler Zellen war auch bei hohen Konzentrationen $\geq 95\%$. Kasumi-1 und 32D-ctrl Zellen zeigen nach Behandlung mit dem Antibiotikum moderate Effekte auf die Vitalität der Zellen. Für Kasumi-1 Zellen wurde bei hohen Konzentrationen von 100 nM Rapamycin eine leicht verminderte Proliferation festgestellt. Hier konnte eine Reduktion vitaler Zellen um etwa 15% gemessen werden. Für 32D-ctrl Zellen wurde, auch

bei niedrigeren Konzentrationen von Rapamycin, eine Reduktion vitaler Zellen um etwa 15%, gemessen. Im Vergleich dazu zeigten 32D Δ trkA Zellen einen starken Effekt nach Behandlung mit Rapamycin. Schon bei geringen Konzentrationen von 12 nM verminderte sich die Zellproliferation und die vitalen Zellen um $\geq 50\%$. Durch höhere Konzentrationen konnte dieser Effekt auf etwa 55% erhöht werden.

3.10. Effekte von Rapamycin und miR-100

Die miR-100 kann durch die Bindung an mTOR und raptor mRNA die Expression der entsprechenden Proteine regulieren. Eine Bindung der miRNA an diese Zielsequenzen resultierte in einer verminderten Proteinexpression (vgl. Abb. 3.6, S. 100). Es stellt sich daher die Frage, wie die miR-100 durch diese Regulierung die Effekte von Rapamycin auf leukämische Zellen beeinflussen kann. Wie in Abschnitt 3.9 gezeigt, sind die hämatopoetischen Zelllinien U937 und K562 Rapamycin insensitiv, Kasumi-1 Zellen zeigten leichte Effekte bei höheren Konzentrationen des Antibiotikums. Aufgrund dieser relativen Rapamycin-Insensitivität, wurde für diese Experimente ein zusätzliches Medikament genutzt. Über diesen „Umweg“ sollte versucht werden, deutlichere Effekte zu erzielen, um so die Wirkung der miR-100 zu untersuchen. Da Rapamycin die Effekte von HDACIs verstärkt [87], wurde für die folgenden Experimente Trichostatin A (TSA) verwendet.

Für die Experimente wurde die miR-100 lentiviral in Kasumi-1 Zellen überexprimiert. Ein entsprechender Kontroll-Vektor diente als Kontrolle. Nach 4 Tagen wurde die Transduktionseffizienz bestimmt und die Zellen für 24 h mit 25 ng/ml TSA oder 25 ng/ml TSA und 100 nM Rapamycin behandelt. Die Effekte auf die Proliferation der Zellen wurden mittels Trypanblau Ausschluss analysiert. Die Proliferation der entsprechenden, unbehandelten Zellen wurde für die Auswertung auf 100% normalisiert. Das Proliferationsverhalten wurde relativ zur entsprechenden, unbehandelten Zelllinie kalkuliert. Dadurch konnten die schon bekannten proliferationsinhibierenden Effekte der miR-100 für die Analysen eliminiert werden.

Die Behandlung von Kontrollzellen mit TSA reduzierte die Proliferation um 34% auf etwa 66% relativ zu unbehandelten Kontrollzellen. Dieser Effekt wurde durch Rapamycin signifikant ($p \leq 0,05$) verstärkt. Die Proliferation wurde zusätzlich um 13% reduziert. Zellen, in denen die miR-100 überexprimiert wurden, zeigen ein verändertes Ansprechen auf TSA. Die Proliferation wurde in diesen Zellen um 49% reduziert. Dieser signifikante Effekt entspricht dem gleichen Effekt, der durch eine Behandlung von Kontrollzellen mit TSA und

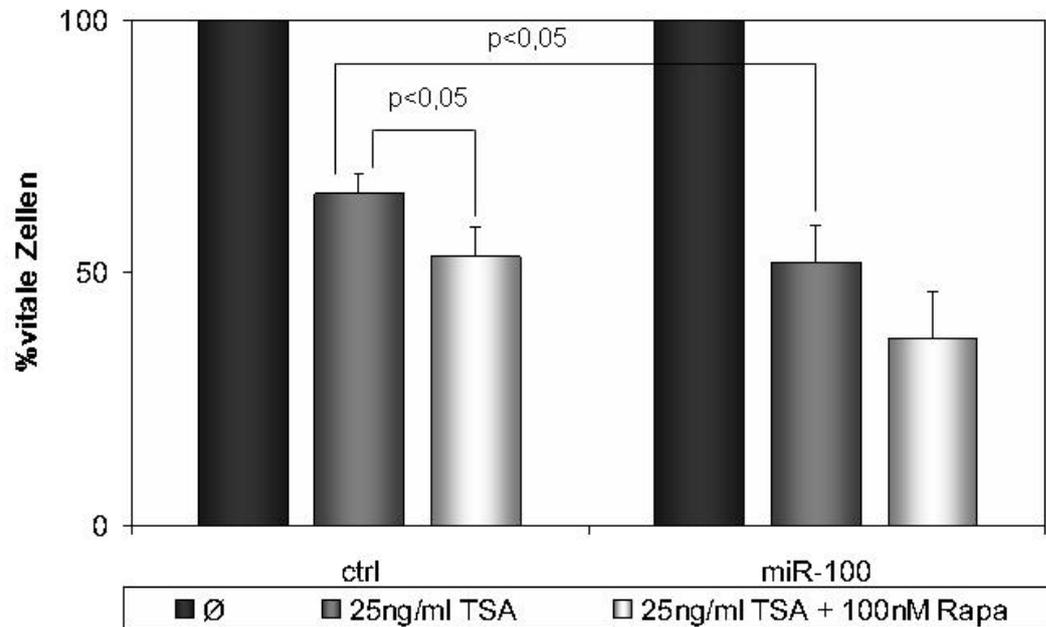


Abbildung 3.16.: Proliferationsverhalten von Kasumi-1 Zellen nach Behandlung mit TSA und Rapamycin. Dargestellt ist der Mittelwert, sowie die Standardabweichung aus drei Experimenten.

Rapamycin erzielt wurde. Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit Rapamycin reduzierte die Proliferationsrate in einem stärkeren Maß. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die miR-100 verstärkt, wie Rapamycin, die Wirkung des HDACI Trichostatin A.

3.11. Effekte der miR-100 auf HuH-7 Zellen

3.11.1. Überexpression der miR-100

HuH-7 ist eine hepatozelluläre Karzinomzelllinie, die eine bekannte Sensitivität gegenüber Rapamycin besitzt [98]. Bereits Konzentrationen von 5 nM hemmen die Proliferation dieser Zellen um etwa 50%. Aufgrund dieses starken Ansprechens auf Rapamycin, wurde diese Zelllinie ebenfalls als Modellsystem zur Analyse der Effekte der miR-100 genutzt.

In HuH-7 wurde die miR-100 lentiviral überexprimiert. Mittels FACS-Analysen wurde die Transduktionseffizienz analysiert. Zur Auswertung der miRNA Überexpression wurde

eine miR-qRT-PCR durchgeführt. Vier Tage nach lentiviraler Transduktion der HuH-7 wurden unter allen Bedingungen etwa 95% GFP positive Zellen gemessen. Die miR-100 konnte 3,8-fach überexprimiert werden. Die Proliferation der Zellen wurde mithilfe eines BrdU-Assay oder Trypanblau Ausschluß bestimmt (s. Abb. 3.17).

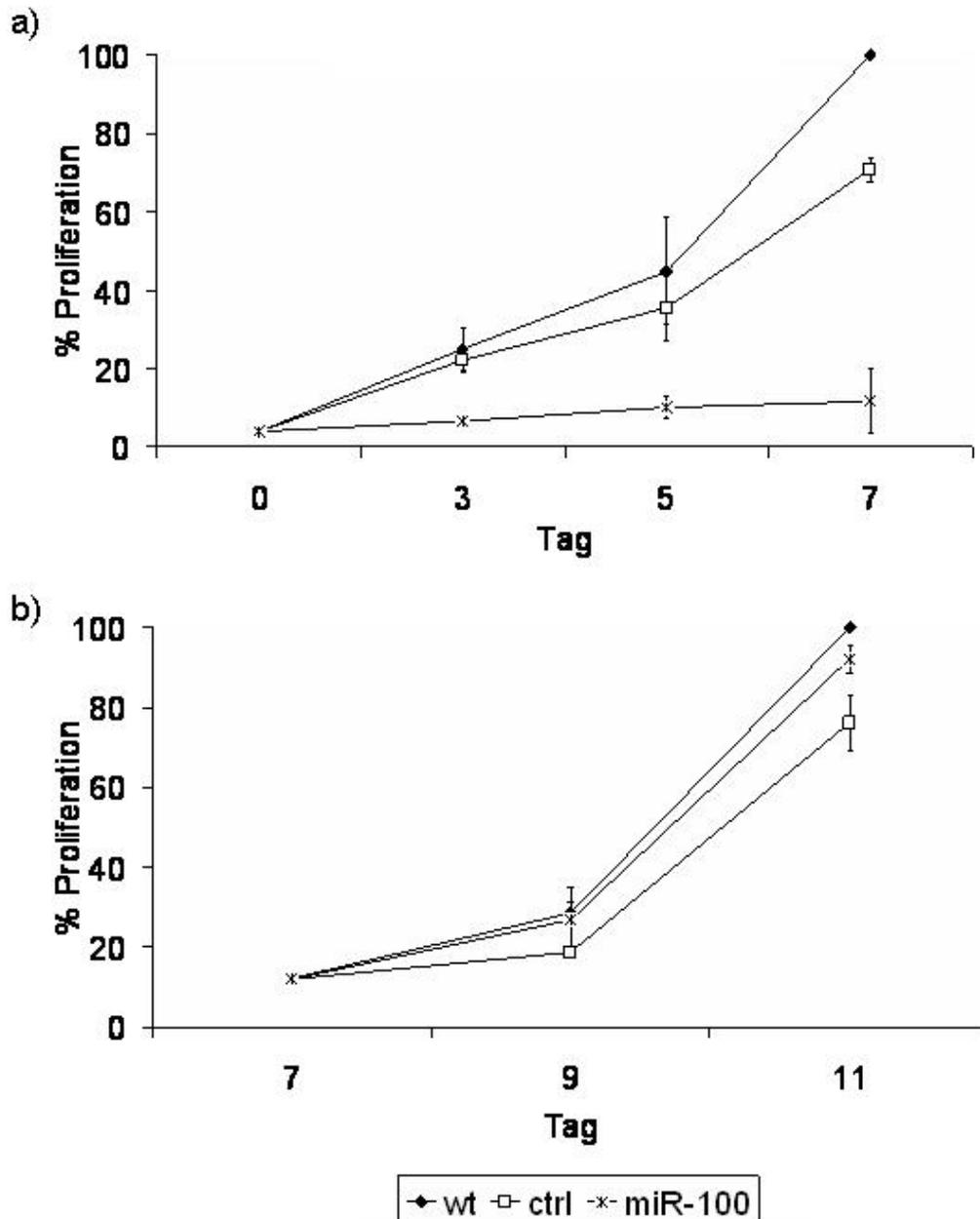


Abbildung 3.17.: Proliferationsverhalten von HuH-7 Zellen nach lentiviraler Transduktion mit miR-100 oder entsprechenden Kontroll-Vektoren. a) Reduktion der Proliferation von HuH-7 bei einer 3,8-fachen Überexpression der miR-100. b) Nach 7 Tagen reduzierte sich die Überexpression der miR-100 auf 1,9-fach. Die Zellen proliferieren dann wie die Wildtyp- und Kontrollzellen.

Während der ersten sieben Tage wurde für miR-100 transduzierte HuH-7 Zellen ein deutlicher Proliferationsnachteil gemessen. Während Kontroll- und Wildtypzellen etwa ähnlich proliferierten, war das Wachstum nach Überexpression der miRNA um über 80% gehemmt. Während dieses Zeitraums reduzierte sich die Anzahl GFP-positiver, miR-100 transduzierter Zellen auf etwa 85%. Die GFP Expression in Kontrollzellen blieb stabil. Weiterhin wurde eine Reduktion der miR-100 in überexprimierenden Zellen festgestellt. Am Tag sieben konnte mittels miR-qRT-PCR eine 1,9-fach Überexpression gemessen werden. Eine Kalkulation der Proliferationsrate über die Zeit von sieben Tagen hinaus zeigte eine veränderte Proliferation der Zellen.

Die Proliferationsrate miR-100 transduzierter Zellen erreichte das Niveau der Kontroll- und Wildtypzellen. Eine Inhibierung des Wachstums durch die miR-100, konnte bei einer etwa 2-fachen Überexpression nicht mehr festgestellt werden.

Eine 4-fache Überexpression der miR-100 in HuH-7 Zellen resultierte in einem deutlichen Proliferationsnachteil dieser Zellen. Nach etwa 7-9 Tagen konnte jedoch nur noch eine etwa 2-fache Überexpression der Zellen gemessen werden. Diese reichte nicht aus, um die Proliferation der Zellen weiter zu hemmen.

3.11.2. miR-100 dosisabhängige Proliferation der HuH-7

Zur weiteren Analyse der miR-100 und ihrer Effekte auf die Zellen, wurde die miRNA in unterschiedlichem Maße überexprimiert. Bis zu einem gewissen Grad kann man die Expression der miRNA durch vermehrte Gabe viralen Überstandes erhöhen. Ab einem bestimmten Punkt wirkt dieser jedoch toxisch und die Zellen sterben. Es ist daher wichtig eine genaue Virusdosierung zu erreichen.

Durch die Zugabe verschiedener Mengen des Virus konnte in HuH-7 Zellen eine verschieden starke Überexpression der miRNA gemessen werden. Durch Einsetzen einer geringeren Virusmenge (MOI=2, *low*) betrug der *Fold Change* der miR-100 am Tag 4 nach Transduktion 2,7. Dieser reduzierte sich bis zum Tag 10 nach Transduktion auf 1. Die Transduktion mit einer MOI von etwa 5 resultierte in einer etwa doppelt so starken Expression der miR-100. In HuH-7 Zellen konnte 4 Tage nach Transduktion eine 5-fache Überexpression der miR-100 erreicht werden (*high*). Nach zehn Tagen wurde für die miRNA noch eine 3,2-fache Überexpression mittels miR-qRT-PCR gemessen. Ein entsprechender Kontroll-Vektor wurden ebenfalls mit verschiedenen MOIs transduziert.

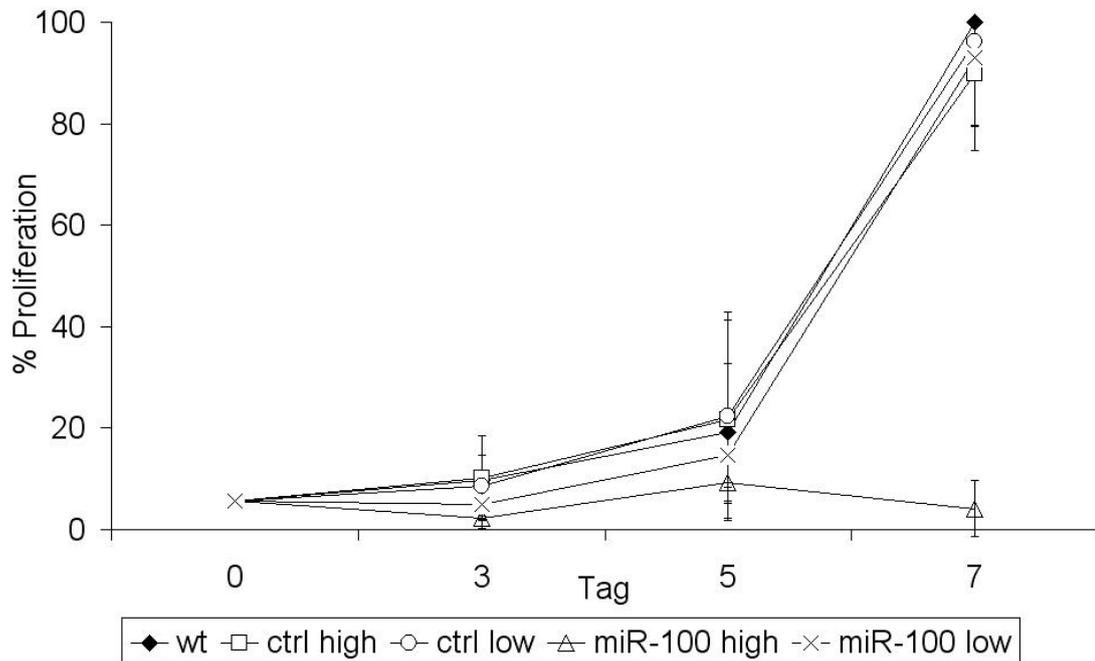


Abbildung 3.18.: Proliferationsverhalten von HuH-7 Zellen nach lentiviraler Transduktion mit miR-100 oder Kontroll-Vektor. Durch eine starke Überexpression der miR-100 wurde die Proliferation der HuH-7 nahezu gestoppt. Eine moderate Überexpression resultierte in einem anfänglichen Proliferationsnachteil der Zellen, der jedoch schnell ausgeglichen wurde.

In diesem Experiment wurde der Effekt der miR-100 auf die Rapamycin-sensitiven HuH-7 deutlicher. Hohe und niedrige Viruskonzentrationen (MOI=2 bzw. MOI=5) des Kontroll-Vektors zeigten keine Unterschiede in der Proliferationsrate der Zellen. Eine moderate Überexpression der miR-100 in diesen Zellen resultierte in einem anfänglichem Proliferationsnachteil der Zellen. Diese erholten sich jedoch schnell und proliferierten in der gleichen Rate wie Kontroll- oder Wildtypzellen. Durch eine etwa 5-fach erhöhte Expression der miR-100 wurde ein deutlicher Effekt auf Zellproliferation der HuH-7 detektiert. Diese Zellen (miR-100 *high*) zeigten über einen langen Zeitraum eine verminderte Proliferationsrate im Vergleich zu miR-100 *low* und Kontrollzellen (vgl. Abb. 3.18). In einem weiteren Experiment wurde eine Überexpression der miR-100 von 10-fach im Vergleich zu Kontrollzellen erreicht. Dies führte zum Sterben miR-100 überexprimierender HuH-7 Zellen nach 16 Tagen.

4. Diskussion

4.1. mikroRNAs bei der AML

Die Leukämien sind eine Gruppe heterogener Erkrankungen des Knochenmarks. Neben akuten und chronischen Formen unterscheidet man zwischen myeloischen und lymphatischen Erkrankungen. Für die AML sind eine Vielzahl zyto- und molekulargenetischer Risikofaktoren bekannt. *Core binding factor* Leukämien, die sich durch eine Inversion 16 oder Translokation (8;21) auszeichnen, haben im Allgemeinen eine gute Prognose. Komplexe Karyotypen oder das Auftreten einer Monosomie 7 sind oft mit einer schlechteren Prognose assoziiert [38]. Diese prognostischen Marker ermöglichen eine zielgerichtete Therapie der Erkrankung.

MiRNAs sind kleine, nicht kodierende RNAs, die durch eine Regulation der Translation die Proliferation, Differenzierung, Apoptose und andere Prozesse der Zelle steuern können [20]. In verschiedenen soliden Tumoren und Leukämien wurde bereits gezeigt, dass miRNAs als diagnostische und prognostische Marker genutzt werden können [27] [28]. So konnten Lu et al. mithilfe von miRNA Expressionsprofilen schlecht differenzierbare Tumore eindeutig klassifizieren. Weiterhin wurde eine allgemein reduzierte miRNA Expression in den malignen Geweben gefunden [24].

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse und Charakterisierung differenziell exprimierter miRNAs bei der AML. Für diese Analysen wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Bei der Methode der miChip Mikroarray Analyse werden viele miRNAs in einem Experiment analysiert. Nachteil dieser Methode ist, dass man RNA in hoher Qualität benötigt, damit entsprechende Sonden gut an die miRNAs binden. Dies ist jedoch, gerade bei Patientenproben nicht immer gegeben. Dadurch können die Ergebnisse verfälscht werden. Ein weiteres Problem ist, dass die eingesetzten Sonden oft schlechte Signale liefern. Die Gründe hierfür können vielfältig sein und man kann nicht zwischen einer nicht-exprimierten miRNA oder einer schlecht gebundenen Sonde unterscheiden. In

dieser Arbeit konnten daher nur 65% der analysierten miRNAs ausgewertet werden. Die miR-qRT-PCR gilt momentan als *state-of-the-art* Methode zur Untersuchung von miRNA Expressionen. Hierbei wird schon während der reversen Transkription ein miRNA spezifischer Primer eingesetzt. Dadurch kann man in einer anschließenden *real-time* PCR die etwa 25 nt langen, reifen miRNAs gut voneinander unterscheiden. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass für jede miRNA eine einzelne Reaktion durchgeführt werden muss. Mittlerweile gibt es jedoch miR-qRT-PCR Arrays, mit denen man 384 miRNAs in einer PCR untersuchen kann.

Die miRNA Expression wurde in der vorliegenden Arbeit mit beiden Methoden analysiert. Viele miRNAs zeigten gleiche Expressionsprofile mit beiden Methoden, auch wenn nicht immer eine statistische Signifikanz der Ergebnisse nachgewiesen werden konnte. Für einige miRNAs konnten jedoch keine übereinstimmenden Ergebnisse gefunden werden. Die miRNAs miR-206, miR-214, miR-222, miR-23b, miR-320, miR-422a und miR-425 zeigten bei der Analyse mittels miChip und miR-qRT-PCR gegenläufige Expressionsprofile. Trotz starker Expressionssignale auf dem Mikroarray und geringen Abweichungen in der miR-qRT-PCR wurden für diese miRNAs keine übereinstimmenden Profile identifiziert. Die Gründe hierfür können vielfältig sein. Ineffektive oder inakkurate miChip oder miR-qRT-PCR Sonden, sowie starke Homologien zu weiteren miRNAs, können die Analyse der miRNAs erschweren. Sind die Sonden nicht spezifisch genug, können diese aufgrund der starken Ähnlichkeiten mehrere miRNAs detektieren. Dadurch kann man verstärkte und somit falsche Expressionsprofile erhalten. Letztendlich sollte die miChip Analyse als eingehende Untersuchung verstanden werden. Durch die Analyse im Hochdurchsatzverfahren kann man eine Vielzahl von Kandidaten-miRNAs erhalten. Diese sollten dann mithilfe der miR-qRT-PCR überprüft werden.

In dieser Arbeit wurden miRNA Expressionsprofile verschiedener AML Subgruppen analysiert. Eine Analyse der miRNA Expression in CD34+ Zellen des Knochenmarks und des peripheren Blutes von Normalpersonen zeigte keine signifikanten Unterschiede der beiden Gruppen. Dieses Ergebnis ermöglichte eine Analyse von AML Proben unterschiedlicher Herkunft im Vergleich zu PB-MNCs von Normal Spendern. Differenziell exprimierte miRNAs der AML sind somit nicht auf die Herkunft der Zellen zurückzuführen. Insgesamt konnte ein Set von 38 miRNAs identifiziert werden, welche zwischen normalen PB-MNCs und CD34+ Zellen der AML unterscheiden. Viele der gefundenen miRNAs weisen einen starken Zusammenhang mit dem hämatopoetischen System auf.

MiR-107 zeigte in dieser Analyse eine erhöhte Expression in Proben der AML mit nor-

malem Karyotyp, t(8;21) und inv(16). Diese miRNA blockiert die Differenzierung später Vorläuferzellen der Hämatopoese [99]. Zhao et al. bestätigten mithilfe eines Reporter-Gen Assay die direkte Bindung der miR-107 an die 3'UTR des Protoonkogens *c-myb*. Eine Reduktion auf Proteinebene konnte jedoch nicht festgestellt werden [100]. C-Myb ist für die Erhaltung des hämatopoetischen Zellzyklus essentiell. Eine Reduktion von c-Myb durch die miRNA könnte daher den Zellzyklus stoppen. Dies wurde von Zhao et al. für eine Überexpression der miR-15a, ebenfalls ein Regulator von c-Myb, nachgewiesen, konnte aber im verwendeten Zellsystem nicht für die miR-107 bestätigt werden. Im Zusammenhang mit c-Myb sollte ebenfalls die miR-150 genannt werden. Diese miRNA kontrolliert die B-Zell Differenzierung durch eine Regulierung von c-Myb [101]. Eine Überexpression der miR-150 blockiert die Differenzierung von pro-B-Zellen zu pre-B-Zellen [102]. In dieser Arbeit wurde eine verstärkte Expression der miR-150 in Zellen der AML detektiert. Die Rolle der miR-150 im myeloiden System ist bis jetzt wenig erforscht. Die miR-150 und miR-107 könnten unabhängig oder gemeinsam die Expression von c-Myb regulieren und so einen Differenzierungsblock der Vorläuferzellen hervorrufen. Dies kann die Entstehung der AML begünstigen.

Im Laufe der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen findet eine Reduktion der Expression der *hox* Gene statt. Eine Unterdrückung dieses Prozesses resultiert in einer Blockierung der Differenzierungsfähigkeit entsprechender Zellen. Dies kann zur Immortalisierung und malignen Transformation der Zelle führen [103] [104]. Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass *hox* Gene vor allem in akuten Leukämien überexprimiert sind [105]. *Hoxa1* ist als Zielgen der miR-10a bestätigt worden [106]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine deutlich reduzierte Expression der miR-10a in den verschiedenen Subgruppen der akuten myeloischen Leukämie festgestellt. Diese verminderte Expression der miRNA, könnte Einfluss auf die Regulierung der *hox* Gene, und somit auf einen Differenzierungsblock der Zellen, haben. Die Regulierung der *hox* Gene durch MLL-Fusionsproteine oder Cdx-Proteine [103] könnte ebenfalls die maligne Transformation hervorrufen. Jongen-Lavrencic et al. konnten für die miR-10a ebenfalls eine reduzierte Expression bei der AML t(8;21) und inv(16) nachweisen, während diese miRNA bei der AML mit NPM1 Mutationen verstärkt exprimiert wird [107]. NPM1 Mutationen sind mit Genexpressionsmustern assoziiert, die eine Überexpression der *hox* Gene beinhalten. Die miR-10a ist innerhalb der *hox* Gene lokalisiert und zeigt daher vermutlich die verstärkte Expression bei der AML mit NPM1 Mutationen. Die genauen Zusammenhänge zwischen der miR-10a und den *hox* Genen bleiben unklar. Die Lokalisation der miRNA innerhalb der *hox* Gen Cluster und das gleichzeitige Potenzial zur Regulierung dieser Gene bedarf weiterer Untersuchungen.

Typische hämatopoetisch assoziierte miRNAs sind miR-181a/b/c, miR-142, miR-221/222 und die miR-223. Diese miRNAs zeigten in der vorliegenden Studie eine erhöhte Expression bei der AML. Eine Korrelation der miRNAs miR-15 und miR-16 mit hämatopoetischen Zellen [26] [100] wurde in dieser Analyse nicht identifiziert. Vielmehr zeichnete sich die miR-15b durch eine sehr homogene Expression bei den AML Zellen und CD34+ Zellen von Normalpersonen aus. Die miRNAs miR-221/222 regulieren die Expression von c-Kit. Ein hoher Gehalt dieser miRNAs korreliert in Erythrozyten mit einer reduzierten Expression von c-Kit [108]. C-Kit ist bei der AML häufig erhöht exprimiert und die Ergebnisse scheinen gegenläufig. Isken et al. detektierten ebenfalls eine erhöhte Expression dieser beiden miRNAs bei Patienten mit AML [109]. Weiterhin wurde nur eine schwache Interaktion der miR-221/222 mit c-kit mRNA und Proteinexpression gemessen. Vermutlich regulieren diese miRNAs die Expression von c-Kit im myeloischen System in einem deutlich geringeren Maß. Weiterhin könnten diese miRNAs als sekundärer Regulator von c-Kit fungieren.

Die miR-223 ist in Zellen myeloischer Herkunft stark exprimiert [110]. Während der Myelo-poese steigt die Konzentration der miR-223 kontinuierlich an. miR-223 wird durch CEBPA positiv beeinflusst. Durch die Bindung von CEBPA an die Promotorregion der miRNA wird die miR-223 verstärkt exprimiert und reduziert wiederum die Expression von NFI-A. Dies führt zu einer vermehrten Differenzierung der Zellen [111]. Im Gegenzug inhibiert eine erhöhte Expression von NFI-A die Expression der miR-223. Eine Blockierung der Transkription der miR-223 resultiert in einer Blockierung der granulozytären Reifung. Teildifferenzierte AML Zellen weisen somit eine höhere Expression dieser miRNA auf, als ihre Vorläuferzellen. In dieser Arbeit wurde eine erhöhte Expression der miR-223 in der Leukämie im Vergleich zu CD34+ Zellen von Normalpersonen detektiert. Die miR-223 wird transkriptionell durch AML1/ETO reguliert. Durch die Rekrutierung von Histon-deacetylasen wird die Transkription hämatopoetisch assoziierter Gene und der miR-223 unterdrückt. Dies führt zur reduzierten Expression der miR-223 und somit zu einem Differenzierungsblock [112]. Eine Korrelation der miR-223 mit der AML t(8;21) konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden.

Für die miRNA miR-181 wurde in dieser Arbeit eine erhöhte Expression bei den AML Subgruppen mit normalen Karyotyp, t(8;21) und inv(16) festgestellt. Debernardi et al. konnten ebenfalls eine erhöhte Expression dieser miRNA bei M1/M2 AML im Vergleich zu den M4/M5 Kategorien der Erkrankung feststellen [113]. Ein ähnliches Expressionsprofil dieser miRNA konnte in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden. Die prognostisch schlechten AML Subgruppen Monosomie 7 und komplexer Karyotyp zeigten keine erhöhte

Expression der miR-181a.

Die miR-142 ist als hämatopoetisch assoziierte miRNA bekannt und eine erhöhte Expression dieser miRNA wurde in verschiedenen hämatologischen und soliden Tumoren nachgewiesen [99] [110]. Eine erhöhte Expression der miR-142 wurde in dieser Untersuchung ebenfalls festgestellt. Die Dysregulierung dieser miRNA kann zu einer veränderten hämatopoetischen Differenzierung führen. Zielgene der miR-142 sind momentan nicht validiert, die Lokalisation der miRNA in der Nähe einer *fragile site* könnte jedoch eine Rolle in der onkogenen Aktivität dieser miRNA spielen [111].

Für die miR-100 wurde in dieser Arbeit eine reduzierte Expression bei der AML t(8;21) im Vergleich zu PB-MNCs festgestellt. Eine leichte Reduktion wurde in Leukämien mit inv(16) gemessen. Dixon-McIver et al. konnten 2008 eine erhöhte Expression der miR-100 bei der AML inv(16) im Vergleich zu Knochenmark von Normalpersonen feststellen [114]. In der Studie wurden in 55% der Patienten mit inv(16) zusätzliche zytogenetische Abweichungen detektiert. Dies könnte ein Grund für die Diskrepanz zu den Daten dieser Studie sein.

Mittels miR-qRT-PCR wurde in dieser Arbeit eine Reduktion von miRNAs der miR-29 Familie, miR-29a/b/c, bei der AML inv(16) detektiert. Diese Reduktion konnte nur für diesen Karyotyp detektiert werden, während die übrigen AML Subgruppen keine Regulation dieser miRNAs zeigten. Für dieses Ergebnis wurde keine statistische Signifikanz nachgewiesen. Ein Grund hierfür könnte in der geringen Anzahl (n=8) untersuchter Patienten liegen. Das anti-apoptotische Protein Mcl-1 wird durch die miR-29b reguliert [115]. Eine reduzierte Expression dieser miRNA könnte daher die Zellen vor dem programmierten Zelltod bewahren und die Entstehung maligner Erkrankungen begünstigen. Weiterhin konnten Pekarsky et al. die Korrelation einer erhöhten Tcl1 Expression mit einem aggressiven B-CLL Phenotyp nachweisen. Tcl1 ist Zielgen der miR-29 und durch eine reduzierte miRNA Expression kommt es zur verstärkten Proteinexpression [116]. Diese Erkenntnisse stützen die These eines Einflusses der miR-29 Familie auf die Entstehung maligner Erkrankungen. Die genaue Funktion dieser miRNAs bei der AML mit inv(16) muss jedoch noch untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Arbeit die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen unterstützt. Anhand der miRNA Expression kann man Leukämien akkurater klassifizieren [117] [118] [114] [107] [119]. Leukämien guter und schlechter Prognose können durch ihre miRNA Expressionsprofile unterschieden werden (miR-107 und miR-181) [113]. Translokation (8;21) Leukämien könnten durch die stark reduzierte Expression der miR-

100 von den übrigen Kategorien unterscheiden werden und die miR-29 Familie scheint eine Rolle bei der AML mit inv(16) zu spielen. Nicht immer konnten die Ergebnisse mit einer statistischen Signifikanz unterlegt werden. Grund hierfür wird vor allem die relativ geringe Anzahl an Patientenproben sein, die für die einzelnen Subgruppen zur Verfügung standen. Letztendlich konnte in dieser Studie ein Set bekannter hämatopoetisch assoziierter miRNAs bestätigt und neue, interessante miRNAs identifiziert werden. Hierzu zählen vor allem die miR-29 Familie sowie die miR-100, die im folgendem Abschnitt näher diskutiert wird.

4.2. miR-100

Die miR-100 nahm in dieser Arbeit eine besondere Stellung ein. Erste Analysen zeigten eine reduzierte Expression dieser miRNA bei der AML mit inv(16) und t(8;21). Weiterführende Untersuchungen bestätigten Proteine des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges (p85 α , Akt2, mTOR, Raptor) als Zielgene der miR-100. Weiterhin wirkt die Überexpression dieser miRNA in verschiedenen Zellen proliferationshemmend.

Die miR-100 gehört zur miR-99 Familie (miR-100, miR-99a, miR-99b) und wird mit der let-7a als polycistronisches Transkript prozessiert. In einigen Organismen (*Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*) wird die miR-125b ebenfalls zu diesem Cluster gezählt (vgl. miRBase [23]). Im menschlichen Genom ist das miR-100/let-7a Cluster auf Chromosom 11q24.1 zu finden. Diese Region ist eine sogenannte *fragile site* und zeichnet sich durch genetische Instabilität aus. Häufiger allelischer Verlust dieser Region korreliert bei Brustkrebserkrankungen mit einer schlechten Prognose [120]. Translokationen in der 11q23.3-11q24 Region sind mit einer Vielzahl humaner Krebserkrankungen assoziiert, unter anderem akuter lymphatischer, akuter myeloischer Leukämie und dem Ewing Sarkom. Das *mll* Gen ist auf 11q23 lokalisiert, welches häufig in akuten Leukämien translokiert ist. Diese Untergruppe der Leukämien stellen eine eigene Klassifizierung hinsichtlich klinischer und biologischer Charakteristika dar. Weiterhin werden *mll* Reorganisationen mit einer schlechten Prognose assoziiert. Eine Schlüsselfunktion vieler MLL Fusionsproteine ist ihre Fähigkeit hämatopoetische Zellen in leukämische Vorläuferzellen zu transformieren [121].

Die miR-100 wird mit verschiedenen malignen Erkrankungen assoziiert. Erhöhte, aber auch reduzierte Expressionen der miRNA wurden in Tumorgewebe gemessen. Beim hepatozellulären Karzinom konnte eine erhöhte Expression der miR-100 festgestellt werden [122]. Die miR-100 und miR-99a zeigten beim serösen Ovarialkarzinom eine niedrigere

Expression, als in gesundem Ovarialgewebe [123]. Eine weitere Studie zeigte ebenfalls eine Reduktion der miR-100 bei 76% aller untersuchten ovarialen Tumorgewebe [124]. Weiterhin wurde eine reduzierte Expression der miR-100 bei oralen Plattenepithelkarzinomzellen identifiziert [125]. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurde von Zhang et al. eine erhöhte Expression der miR-100 bei der pädiatrischen akuten Leukämie gemessen [126]. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich adulte Leukämien untersucht, wodurch sich die Diskrepanz zu den Ergebnissen von Zhang erklären lässt.

Für die miR-100 wurden mithilfe der verschiedenen Programme verhältnismäßig wenig Zielgene gefunden. Üblicherweise liefert der TargetScan Algorithmus weit über 100 potenzielle Zielgene für verschiedene miRNAs, für einige werden bis zu tausend Zielgene vorausgesagt. Die miR-100 scheint daher, mit nur 40 potenziellen Zielgenen, eine Ausnahmestellung einzunehmen. Ein Grund für diese Besonderheit könnte in dem Alter der miRNA liegen. Es wird vermutet, dass die miR-100 die älteste miRNA ist [127]. Sie ist daher hochkonserviert. Dies erschwert die Bestimmung potenzieller Zielgene.

4.3. miR-100 Zielgene

Die Vorhersage von miRNA Zielgenen gestaltet sich problematisch, da eine miRNA mit einer *Seed*-Sequenz von 7-8 nt Länge mehrere tausend Gene regulieren kann. Viele Programme zur miRNA Zielgenanalyse beruhen auf der Basenpaarung der *Seed*-Sequenz oder der *Cross-Spezi* Konservierung (vgl. Kapitel 1.1.5). Das Programm *OTTO* verknüpft diese Programme mit dem RNA22 Algorithmus und berücksichtigt weitere Faktoren. Die freie Faltungsenergie hat, neben der genauen Position der miRNA-Bindungsstelle innerhalb der 3'UTR des Zielgens, eine entscheidende Rolle in der Vorhersage potenzieller Zielgene. Chi et al. erkannten, dass 63% der potenziellen Bindungsstellen in der 3'UTR der mRNA zu finden sind [96]. Diese befinden sich dort vorwiegend am Anfang oder Ende der 3'UTR. Die miR-100 Zielgene mTOR, Raptor und Akt2 zeigen ebenfalls Bindungsstellen mit der miRNA am Beginn der 3'UTR. P85 α hingegen weist eine Bindungsstelle in der Mitte der 3'UTR auf, was nicht ungewöhnlich, jedoch selten ist [96].

Die Faltungsenergie bei einer miRNA:mRNA Bindung könnte einen Einfluss auf die Funktion der miRNA haben. Die Bindungsstelle der miR-100 in der mTOR 3'UTR besitzt eine sehr günstige Faltungsenergie von -29,7 kcal/mol. Durch eine lentivirale Überexpression der miRNA wurde eine starke Reduktion des Proteins festgestellt (s. Abb. 3.6, S. 100).

Eine deutlich geringere Reduktion des Proteins nach einer miR-100 Überexpression wurde für Raptor detektiert. Ein möglicher Grund könnte die geringere Faltungsenergie sein. Mit $-26,2$ kcal/mol und $-25,5$ kcal/mol scheint diese ungünstiger zu sein, als für die übrigen analysierten Zielgene. Weiterhin könnten auch die Gesamtmenge an Raptor Protein, sowie die Affinität der verwendeten Antikörper diese Ergebnisse erklären.

Weiterhin wurde in den Analysen der vorliegenden Arbeit häufig eine Bindung von miRNA:mRNA im 3'-Bereich der miRNA beobachtet. Die Nukleotide 10-14 der miRNA scheinen in der Heteroduplex oft in ungebundener Form vorzuliegen. Die miRNA wird im RISC an Argonaute 2 gebunden und zur Zielsequenz geführt. Dort zerschneidet RISC die miRNA:mRNA Duplex im Falle einer vollständigen Bindung zwischen den Nukleotiden 10 und 11. Bei nicht vollständiger Bindung der miRNA an die mRNA wird die Translation inhibiert. Ein Grund hierfür könnte die fehlende Bindung im mittleren Bereich der miRNA:mRNA Duplex sein. Dieses Muster weisen alle in dieser Arbeit bestätigten Zielgene der miR-100 auf (vgl. Anhang 5.4). Vermutlich konnte daher keine Reduktion der Zielgen-mRNA, jedoch von Protein nach einer miR-100 Überexpression detektiert werden (vgl. Abb. 3.10, S. 105, Abb. 3.6, S. 100).

G:U Basenpaarung und die Position von *Bulges* können vermutlich ebenfalls Einfluss auf die Funktion der miRNA haben. Die p110 δ Untereinheit der PI3K konnte, trotz potenzieller Bindungsstellen, nicht experimentell als Zielgen der miR-100 validiert werden. Ein Grund könnte sein, dass oben genannte Muster hier nicht vorliegen. Die miRNA ist fest im RISC verankert. *Bulges* in der *Seed*-Sequenz auf miRNA Seite könnten daher für die Funktion der miRNA nachteilig sein. Ein *Bulge* auf mRNA Seite scheint weniger problematisch, da die mRNA flexibel mit dem RISC interagieren kann. Dieses Muster wurde z.B. für eine Bindungsstelle von Raptor identifiziert. P110 δ enthält hingegen einen *Bulge* auf miRNA Seite. Dies könnte erklären, warum p110 δ nicht als Zielgen der miR-100 bestätigt werden konnte. Wang et al. erzielten mithilfe struktureller Analysen von *guide DNA: target RNA*-Argonaute Komplexen ähnliche Ergebnisse zur Struktur der miRNA:mRNA Bindung [128].

Eine Besonderheit weist die Bindung der miR-100 an die 3'UTR von p85 α auf. Nach einer Basenpaarung der Nukleotide 1-6 der 5'-Region der miRNA scheint ein *Bulge* (Position 7-8) auf miRNA Seite zu folgen. Brennecke et al. fanden heraus, dass eine Basenpaarung über die Nukleotide 2-5 in der *Seed*-Sequenz für eine effiziente Zielgenregulierung ausreichen kann. Im Vergleich dazu ist eine Basenpaarung der Nukleotide 1-4 komplett ineffektiv [129]. Ob die tatsächliche Struktur der Bindung von miR-100 und p85 α in dieser Form

vorliegt, kann nicht sicher gesagt werden. Vermutlich wird der *Bulge* nicht produziert, so dass die Nukleotide 7-12 der miRNA:mRNA Duplex nicht gebunden vorliegen. Die kurze Bindung der *Seed*-Sequenz scheint ausreichend für eine Inhibierung der Translation von p85 α durch die miR-100.

4.4. miR-100 und die PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade

In dieser Arbeit wurden verschiedene Proteine des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges als potenzielle Zielgene der miR-100 identifiziert. Erste Assoziationen der miR-100 mit mTOR wurden bereits 2008 von Wang et al. beschrieben [130]. Sie stellten fest, dass die miR-100 nach einer humanen Cytomegalievirus Infektion reduziert ist. Mithilfe einer Reporter-gen Analyse konnten sie die Interaktion der miR-100 mit der 3'UTR von mTOR nachweisen. Erst kürzlich zeigten auch Nagaraja et al. die Regulation von mTOR durch die miR-100 [131]. Diese Interaktion von miR-100 mit mTOR konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (vgl. Abb. 3.6, S. 100, Abb. 3.9, S. 104). mTOR wurde über die TargetScan Analyse als potenzielles Zielgen der miR-100 identifiziert. Vor dem Hintergrund, dass eine miRNA eine ganze Signalkaskaden regulieren kann [95], wurde der gesamte PI3K/Akt/mTOR-Signalweg in dieser Arbeit genauer untersucht. Hierbei konnten neben Raptor auch Akt2 und p85 α als Ziele der miR-100 validiert werden (vgl. Abb. 3.6, S. 100). Weitere Proteine des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges sind ebenfalls potenzielle Ziele der miR-100 identifiziert worden. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) ist ein Wachstumsfaktor, der mit dem Insulin oder IGF-1 Rezeptor (IGF-1R) interagiert, welcher dann autophosphoryliert wird. *Down-stream* Signalwege, wie der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg werden über diesen Mechanismus aktiviert und Apoptose, Proliferation und Zellentwicklung reguliert [132]. Tovar et al. zeigten erst kürzlich, dass die Expression der miR-100 invers mit der Aktivierung von IGF-1R korreliert [133]. Tatsächlich wurde für IGF-1 in dieser Arbeit eine potenzielle Bindungsstelle für die miR-100 identifiziert (vgl. Abb. 3.4, S. 95). Als potenzielle Zielgene der miR-100 wurden im Signalweg ebenfalls inhibitorische Proteine der Signalkaskade identifiziert, unter anderem TSC1. Dies scheint widersprüchlich zu der Annahme, dass die miR-100 den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg negativ beeinflusst. Ob TSC1 tatsächlich Zielgen der miR-100 ist, wurde in dieser Arbeit nicht überprüft. Die Funktion einer eventuellen Regulierung sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Die miR-100 reguliert die PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade durch eine Reduktion verschiedener Mediatoren des Signalweges. Eine Überexpression der miR-100 in verschiede-

nen Zellen führte zu einer Reduktion der Proliferation. Dies könnte sich auf die Hemmung der PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade zurückführen lassen. Henson et al. identifizierten ebenfalls eine reduzierte Proliferation von oralen Plattenepithelkarzinomzellen nach einer Überexpression der miR-100 und postulierten eine Rolle dieser miRNA in der Entstehung und Entwicklung dieser malignen Erkrankung [125].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer miR-100 Überexpression auf verschiedene Zelllinien untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sprechen für eine Korrelation von Rapamycin-Sensitivität und der Sensitivität der Zellen gegenüber der miR-100. Die Zelllinien U937 und K562 wiesen keine Sensitivität gegenüber Rapamycin auf und eine erhöhte Expression der miR-100 in diesen Zellen zeigte kein verändertes Proliferationsverhalten. Die Behandlung von Kasumi-1 und 32D-ctrl Zellen mit Rapamycin resultierte in einem moderaten proliferationshemmenden Effekt auf die Zellen. Diese Zellen zeigten bei stabiler Überexpression der miR-100 eine verringerte Proliferation. 32D Δ trkA zeichnen sich durch einen konstitutiv, aktivierten mTOR-Signalweg aus. Eine Behandlung dieser Zellen mit Rapamycin resultierte in einer starken Reduktion der Proliferation ($\geq 55\%$). Durch die stabile Überexpression der miR-100 in diesen Zellen verminderte sich die Proliferation um über 70% (vgl. Kapitel 3.8, S. 106). Weiterhin zeigten vorläufige Experimente $\geq 90\%$ apoptotische Zellen nach einer miR-100 Überexpression in der Zellkultur. Durch eine hohe Proliferationsrate von 32D Δ trkA Zellen, erholen sich die Zellen relativ schnell und der Effekt der miRNA verblasst nach einer gewissen Zeit. Ein Grund für dieses „*Recovern*“ der Zellen ist vermutlich das Überleben des „Bestangepassten“. Zellen mit einer sehr stark erhöhten miR-100 Expression haben einen deutlichen Proliferationsnachteil, während Zellen mit geringer miR-100 Überexpression besser proliferieren. Diese Zellen setzten sich daher in der Zellkultur gegenüber Zellen mit hoher miR-100 Expression durch. Die Konzentration an miR-100 in den verbleibenden Zellen reicht dann nicht mehr aus, um einen Effekt zu erzielen. Ein ähnliches Phänomen wurde für HuH-7 Zellen beobachtet. Diese Zelllinie ist ebenfalls Rapamycin sensitiv und die Überexpression der miR-100 vermindert dosisabhängig die Proliferation der Zellen. Ein Effekt konnte hier jedoch auch nur kurzzeitig gemessen werden (s. Abb. 3.17, S. 113). Eine Möglichkeit dieses *Recovern* der 32D Δ trkA und HuH-7 Zellen nach einer miR-100 Überexpression zu umgehen, kann in einer mehrmaligen Applikation der miRNA bestehen. Durch eine wiederholte Transfektion oder lentivirale Transduktion der Zellen könnte eine stabil erhöhte Expression der miR-100 in diesen Zelllinien erzielt werden.

Rapamycin wirkt als selektiver Inhibitor von mTORC1 und nimmt, ebenso wie die miR-100, Einfluss auf die PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade. Nagaraja et al. konnten für die

Ovarialkarzinomzelllinie OVSAYA nach Überexpression der miR-100 eine erhöhte Sensitivität der Zellen gegenüber Rapamycin feststellen [131]. Diese Ergebnisse stützen die Analysen der miR-100 in Kasumi-1 Zellen. Die miR-100 scheint die Effekte von Rapamycin simulieren zu können. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch die Behandlung von Kontrollzellen mit TSA und Rapamycin gleiche Effekte erzielt werden können, wie durch die Überexpression der miR-100 und eine Behandlung mit TSA (vgl. Abb. 3.16, S. 112). Dies könnte auf die Wirkung der miRNA auf die Bestandteile des mTORC1 Komplexes zurückzuführen sein. Die miR-100 kann die Expression von mTOR und Raptor und somit auch die Effizienz vom mTORC1 reduzieren. Gleiches macht Rapamycin. Durch die Dissoziation von Raptor aus dem Komplex, wird dessen Funktion inhibiert.

Rapamycin ist in leukämischen Zellen wenig effizient. Die Gründe hierfür sind nicht eindeutig bekannt. In seltenen Fällen wird eine Aktivierung von Akt nach Behandlung der Zellen mit Rapamycin beobachtet. Dies könnte am negativen *Feedback*-Mechanismus der p70S6K liegen. Durch eine hohe Konzentration von phosphoryliertem p70S6K wird IRS1 inhibiert und somit ebenfalls die PI3K gehemmt [53]. Die Reduktion der p70S6K Phosphorylierung reduziert die negative Regulierung der PI3K und führt zu einer verstärkten Aktivierung dieser. Die Überexpression der miR-100 sollte diesen *Feedback*-Mechanismus unterdrücken, da die miRNA die Expression von PI3K und weiteren Mediatoren des Signalweges hemmt. Auf diesem Wege könnte die Überexpression der miR-100 in leukämischen Zellen die medikamentöse Behandlung mit Rapamycin verbessern und unterstützen.

Zu beachten ist jedoch, dass Pim2 4E-BP1, einen *Down-stream* Mediator des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges reguliert. Die Phosphorylierung von 4E-BP1 durch Pim-2 und somit die Aktivierung der Cap-abhängigen Translation ist daher Rapamycin-insensitiv [134]. Aus diesem Grund ist dieser Mechanismus ebenfalls miR-100 unabhängig. Weitere Analysen haben jedoch gezeigt, dass die let-7a, welche als Cluster mit der miR-100 transkribiert wird, eine potenzielle Bindungsstelle in der 3'UTR von 4E-BP1 aufweist. Tatsächlich wurden für die let-7a mehrere potenzielle Zielgene in der PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade identifiziert, so dass durch eine gezielte Überexpression des miR-100/let-7a Clusters nahezu der gesamten Signalweg reguliert werden könnte (vgl. Abb. 4.1, S. 128).

4.5. Zusammenfassung und Ausblick

Anhand von miRNA Expressionsprofilen kann man Tumore und auch Leukämien klassifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Vielzahl differenziell exprimierter miRNA

bei der akuten myeloischen Leukämie und Normalpersonen identifiziert, die eine Klassifizierung und teilweise auch Zuordnung zu einer Subgruppe erlauben. In dieser Untersuchung wurde neben den bekannten miRNAs, wie der miR-223, miR-142 oder miR-107, zusätzlich die miR-100 als potenzieller Marker der t(8,21) Leukämien identifiziert. Diese miRNA kann als Regulator des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges, welcher in vielen Tumoren aktiviert ist, fungieren. Durch die verringerte Expression der miR-100 in der Leukämie entfällt ein negativer Regulator dieser Signalkaskade. Die miR-100 kann als einer von vielen Mechanismen zur Aktivierung der Signalkaskade und somit zum malignen Phänotyp beitragen.

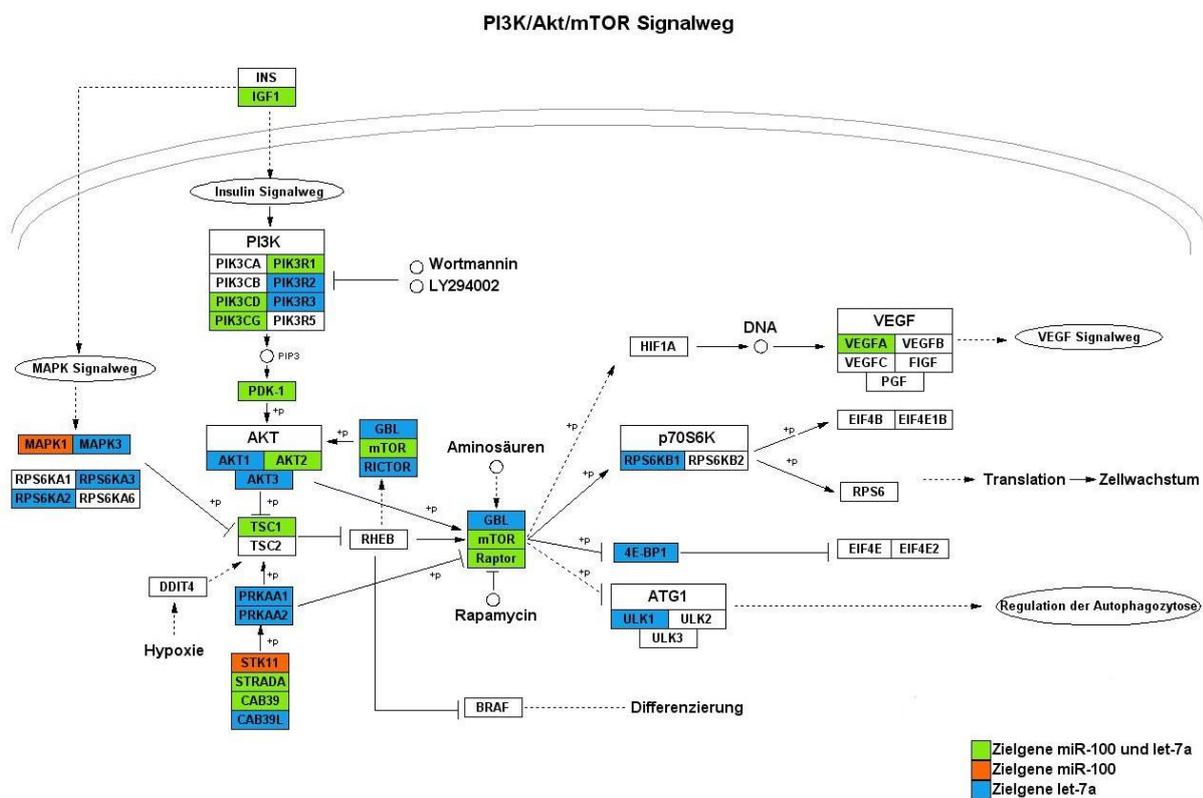


Abbildung 4.1.: Die PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade. In grün sind die potenziellen Zielgene der miR-100 und der let-7a dargestellt. Rot unterlegte Zielgene haben nur Bindungsstellen für die miR-100 in ihrer 3'UTR, blau markierte Zielgene haben nur Bindungsstellen für die let-7a in der 3'UTR. Die Bindungsstellen wurden für eine maximale Faltungsentnergie von -25 kcal/mol mithilfe des Programms *OTTO* berechnet.

In weiterführenden Analysen sollte nun geklärt werden, welche weiteren potenziellen Zielgene der miR-100 im PI3K/Akt/mTOR-Signalweg validiert werden können. Interessant

ist zunächst PDK-1, welches *upstream* von Akt wirkt. Weiterhin sollte die Interaktion von TSC1 und der miR-100 näher untersucht werden. TSC1 fungiert, ebenso wie die miR-100, als negativer Regulator von mTOR. Zusätzlich sollte die Funktion der let-7a in der Signalkaskade untersucht werden. Diese miRNA wird als Cluster zusammen mit der miR-100 prozessiert und weist ebenfalls mehrere potenzielle Zielgen innerhalb der PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade auf (vgl. Abb. 4.1, S. 128). Durch eine gezielte Regulierung der PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade könnte mithilfe der miR-100 und let-7a eine medikamentöse Therapie von Tumoren und Leukämien unterstützt werden. Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg kann so einen neuen therapeutischen Ansatz zur Behandlung von Leukämien darstellen.

5. Anhang

5.1. Script zur Analyse mittels R und Bioconductor

```
# Einbinden von biobase
>library(biobase)

# Einlesen der Expression Set Daten
>exprsFile <- " ...csv"
>exprs <- as.matrix(read.table(exprsFile, header=TRUE, sep=";", row.names=1, as.is=TRUE))

# Überprüfung, ob alle Daten korrekt eingelesen wurden
>class(exprs)          # sollte "matrix" anzeigen
>dim (exprs)          # sollte die Dimensionen anzeigen
>colnames(exprs)      # sollte die Spaltennamen anzeigen
>head(exprs)         # sollte die ersten 10 Zeilen der matrix anzeigen

# Erstellen der Phenotype Data
>pDatafile <- "...tsv"
>pData <- read.table(pDatafile, row.names=1, header=TRUE, sep="\t")

# Überprüfung, ob alle Daten korrekt eingelesen wurden
>dim (pData)
>rownames(pData)
>all(rownames(pData)==colnames(exprs))
>names(pData)
>sapply(pData, class)

# Erstellen des Annotated Data Frame
>phenoData <- new("AnnotatedDataFrame", data=pData)

# Erstellen des Expression Set
>eset <- new("ExpressionSet", exprs=exprs, phenoData = phenoData)

# Aufrufen und Überprüfen des Expression Set
>eset$type
>featureNames(eset)
>sampleNames(eset)

# Einbringen des limma Modells und Kalkulation
>library(limma)
>f<-factor(as.character(eset$type))
```

```
>design <- model.matrix(~f)
>fit <- eBayes(lmFit(eset,design))
>results<-decideTests(fit, adjust.method="fdr")
>summary(results)
>topTable(fit,coef=2)

# Toptable im Arbeitsbereich ablegen
>write.table(topTable(fit, coef=2, number=24), "...txt")

# Erstellen einer Heatmap

# Auswahl des Sets und der signifikanten p-Werte für Interzept und vergleichenden Teil
>sum(fit$p.value[,1]<0.05)
>sum(p.adjust(fit$p.value[,1], method="fdr")<0.05)

>sum(fit$p.value[,2]<0.05)
>sum(p.adjust(fit$p.value[,2], method="fdr")<0.05)

# Auswahl der Daten zum Erstellen einer Heatmap
>selected <-(p.adjust(fit$p.value[,2],method="fdr")<0.05)
>sel <- eset[selected, ]

# Auswahl der Farben und Erstellen der Heatmap
>heatmap(exprs(sel))
>heatmap(exprs(sel), col=topo.colors(100))
```

5.2. Ergebnisse der Zielgenanalyse der miR-100 mittels TargetScan

Target Gene	Total Context Score	Aggregate P _{Ct}
THAP2	-0,51	0,11
KBTBD8	-0,47	≤0,1
C4orf16	-0,42	≤0,1
HS3ST3B1	-0,41	≤0,1
HS3ST2	-0,40	≤0,1
CTDSPL	-0,38	≤0,1
SMARCA5	-0,36	≤0,1
EPDR1	-0,36	≤0,1
TTC39A	-0,35	≤0,1
RAVER2	-0,35	≤0,1
FGFR3	-0,32	≤0,1
ZZEF1	-0,32	≤0,1
ADCY1	-0,31	≤0,1
EIF2C2	-0,30	≤0,1
BAZ2A	-0,29	≤0,1
FRAP1	-0,29	≤0,1
FKBP5	-0,28	≤0,1
FZD8	-0,26	≤0,1
CLDN11	-0,26	≤0,1
TRIB2	-0,23	≤0,1
HOXA1	-0,22	≤0,1
PPP3CA	-0,21	≤0,1
FZD5	-0,21	≤0,1
SLC44A1	-0,20	≤0,1
IGF1R	-0,19	≤0,1
PPP1CB	-0,18	0,11
GRHL1	-0,18	0,11
TRIB1	-0,18	0,11
BMPR2	-0,17	0,11
MBNL1	-0,17	≤0,1
MTMR3	-0,14	≤0,1
FAM152A	-0,14	0,11
CCDC21	-0,14	0,11
PI15	-0,14	0,11
PPFIA3	-0,11	0,11
ICMT	-0,10	≤0,1
NXF1	-0,07	0,11
CYP26B1	-0,07	≤0,1
SMARCD1	-0,05	0,11
ZBTB7A	-0,05	0,11

5.3. Ergebnisse der Zielgenanalyse der miR-100 mittels PicTar

Target Gene	PicTar Score	Rank
SMARCA5	4.76	1
BAZ2A	4.56	2
VLDLR	3.82	3
HS3ST3B1	3.55	4
HS3ST2	3.07	5
FOXA1	3.01	6
EPC2	2.92	7
FRAP1	2.87	8
EIF2C2	2.87	9
C4orf16	2.80	10
FZD8	2.71	11
INSM1	2.60	12
HOXA1	2.51	13
KIAA1579	2.43	14
CDW92	2.27	15
MGC39518	2.24	16
HOXA1	2.22	17
MBNL1; tv5	2.14	18
MBNL1; tv3	2.14	19
MBNL1; tv6	2.14	20
MBNL1; tv1	2.14	21
MBNL1; tv2	2.14	22
MBNL1; tv4	2.14	23
MBNL; tv7	2.12	24
PHOX2B	2,00	25
TA-KRP	1.97	26
FGFR3; tv1	1.97	27
FGFR3; tv2	1.97	28
TRIB2	1.94	29
ZDHHC18	1.80	30
ZZEF1	1.76	31
MTMR3; tv3	1.70	32
MTMR3; tv2	1.70	33
MTMR3; tv1	1.70	34
ICMT; tv1	1.69	35
ICMT; tv2	1.69	36
OGT	1.48	37
TRAF7	1.47	38
CYP26B1	1.39	39
CTDSPL	1.37	40
ADCY1	0.69	41

p110δ

Position in 3'UTR 507 to 528; Faltungsennergie= -27.6 Kcal/mol

```

5'<-- target -->3'      -linker-      5'<-- microRNA -->3'
CTTTTCAAGTGGGTCTTGGGTAGCGGGACGCAACCCGUAGAUCCGAACUUGUG
.....(((((((((((((((((.-----)))))))))..
CTTTTCAAGT--GGGTCT-TGGGTA
      |||||  |||||  |||||
GU---GUUCAAGCCUAGAUGCCCAA
    
```

Position in 3'UTR 1337 to 1358; Faltungsennergie= -25.2 Kcal/mol

```

5'<-- target -->3'      -linker-      5'<-- microRNA -->3'
GATGGGGCTAGGACTGTGGGCTGCGGGACGCAACCCGUAGAUCCGAACUUGUG
..(((((.....(((((((((((((.-----)))))))))..
GATGGGGCTAGGA-CTGTGGGCT
  |  |  |  |  |  |  |  |
GUGUUCAAG-CCUAGAUGCCCAA
    
```

Rictor

Keine Zielsequenzen für die genutzten Einstellungen von einer ungepaarten Base in einer Seed-Sequenz von 7 Nukleotiden, 14 gepaarte Basen in der Heteroduplex und einer maximalen Faltungsennergie von -25 kcal/mol.

Abbildung 5.1.: Listung der potenziellen Bindungsstellen der miR-100 für mTOR, Raptor, p85α, Akt2 sowie p110δ. Für Rictor wurden keine Bindungsstellen gefunden.

Literaturverzeichnis

- [1] KLUG, W., M. CUMMINGS und C. SPENCER: *Concepts of Genetics*. Pearson, 8. Auflage, 2003.
- [2] KROL, A. R. VAN DER, L. A. MUR, M. BELD, J. N. MOL und A. R. STUITJE: *Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression*. *Plant Cell*, 2(4):291–299, Apr 1990.
- [3] SHARP, P. A.: *RNA interference–2001*. *Genes Dev*, 15(5):485–490, Mar 2001.
- [4] MCMANUS, M.T. und P. A. SHARP: *Gene silencing in mammals by small interfering RNAs*. *Nat Rev Genet*, 3(10):737–747, Oct 2002.
- [5] DYKXHOORN, D. M., C. D. NOVINA und P. A SHARP: *Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(6):457–467, Jun 2003.
- [6] MONTGOMERY, M. K. und A. FIRE: *Double-stranded RNA as a mediator in sequence-specific genetic silencing and co-suppression*. *Trends Genet*, 14(7):255–258, Jul 1998.
- [7] FIRE, A., S. XU, M. K. MONTGOMERY, S. A. KOSTAS, S. E. DRIVER und C. C. MELLO: *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans**. *Nature*, 391(6669):806–811, Feb 1998.
- [8] SLEDZ, C. A., M. HOLKO, M. J. DE VEER, R. H. SILVERMAN und B. R. G. WILLIAMS: *Activation of the interferon system by short-interfering RNAs*. *Nat Cell Biol*, 5(9):834–839, Sep 2003.
- [9] ELBASHIR, S. M., J. HARBORTH, K. W. und T. TUSCHL: *Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs*. *Methods*, 26(2):199–213, Feb 2002.

- [10] SCHERR, M., M. A. MORGAN und M. EDER: *Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells*. *Curr Med Chem*, 10(3):245–256, Feb 2003.
- [11] BRUMMELKAMP, TH. R., R. BERNARDS und R. AGAMI: *A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells*. *Science*, 296(5567):550–553, Apr 2002.
- [12] PADDISON, P. J., A. A. CAUDY, R. SACHIDANANDAM und G. J. HANNON: *Short hairpin activated gene silencing in mammalian cells*. *Methods Mol Biol*, 265:85–100, 2004.
- [13] HENRIKSEN, J. R., C. LØKKE, M. HAMMERØ, D. GEERTS, R. VERSTEEG, T. FLAEGSTAD und C. EINVIK: *Comparison of RNAi efficiency mediated by tetracycline-responsive H1 and U6 promoter variants in mammalian cell lines*. *Nucleic Acids Res*, 35(9):e67, 2007.
- [14] SCHERR, M. und M. EDER: *Gene silencing by small regulatory RNAs in mammalian cells*. *Cell Cycle*, 6(4):444–449, Feb 2007.
- [15] LEE, R. C., R. L. FEINBAUM und V. AMBROS: *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. *Cell*, 75(5):843–854, Dec 1993.
- [16] AMBROS, V.: *microRNAs: tiny regulators with great potential*. *Cell*, 107(7):823–826, Dec 2001.
- [17] SCHERR, M., L. VENTURINI und M. EDER: *Lentiviral Vector-Mediated Expression of pre-miRNAs and AntagomiRs*. *Methods Mol Biol*, 614:175–185, 2010.
- [18] YU, J., F. WANG, G-H. YANG, F-L. WANG, Y-N. MA, Z-W. DU und J-W. ZHANG: *Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines*. *Biochem Biophys Res Commun*, 349(1):59–68, Oct 2006.
- [19] ZENG, Y., R. YI und B. R. CULLEN: *Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha*. *EMBO J*, 24(1):138–148, Jan 2005.
- [20] BARTEL, D. P.: *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. *Cell*, 116(2):281–297, Jan 2004.

- [21] OUELLET, D. L., M. P. PERRON, L-A. GOBEIL, P. PLANTE und P. PROVOST: *MicroRNAs in Gene Regulation: When the Smallest Governs It All*. J Biomed Biotechnol, 2006(4):69616, 2006.
- [22] LEWIS, B. P., C. B. BURGE und D. P. BARTEL: *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell, 120(1):15–20, Jan 2005.
- [23] MIRBASE: *www.mirbase.org*. Release 14, Sept. 2009.
- [24] LU, J., G. GETZ, E. A. MISKA, E. ALVAREZ-SAAVEDRA, J. LAMB, D. PECK, A. SWEET-CORDERO, B. L. EBERT, R. H. MAK, A. A. FERRANDO, J. R. DOWNING, T. JACKS, H. R. HORVITZ und T. R. GOLUB: *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature, 435(7043):834–838, Jun 2005.
- [25] CALIN, G. A., C. SEVIGNANI, C. D. DUMITRU, T. HYSLOP, E. NOCH, S. YENDAMURI, M. SHIMIZU, S. RATTAN, F. BULLRICH, M. NEGRINI und C. M. CROCE: *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 101(9):2999–3004, Mar 2004.
- [26] CALIN, G. A., C. D. DUMITRU, M. SHIMIZU, R. BICHI, S. ZUPO, E. NOCH, H. ALDLER, S. RATTAN, M. KEATING, K. RAI, L. RASSENTI, T. KIPPS, M. NEGRINI, F. BULLRICH und C. M. CROCE: *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 99(24):15524–15529, Nov 2002.
- [27] CIMMINO, A., G. A. CALIN, M. FABRI, M. V. IORIO, M. FERRACIN, M. SHIMIZU, S. E. WOJCIK, R. I. AQEILAN, S. ZUPO, M. DONO, L. RASSENTI, H. ALDLER, S. VOLINIA, C-G. LIU, T. J. KIPPS, M. NEGRINI und C. M. CROCE: *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 102(39):13944–13949, Sep 2005.
- [28] J.TAKAMIZAWA, H. KONISHI, K. YANAGISAWA, S. TOMIDA, H. OSADA, H. ENDOH, T. HARANO, Y. YATABE, M. NAGINO, Y. NIMURA, T. MITSUDOMI und T. TAKAHASHI: *Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival*. Cancer Res, 64(11):3753–3756, Jun 2004.

- [29] JOHNSON, S. M., H. GROSSHANS, J. SHINGARA, M. BYROM, R. JARVIS, A. CHENG, E. LABOURIER, K. L. REINERT, D. BROWN und F. J. SLACK: *RAS is regulated by the let-7 microRNA family*. Cell, 120(5):635–647, Mar 2005.
- [30] MENDELL, J. T.: *miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease*. Cell, 133(2):217–222, Apr 2008.
- [31] VENTURINI, L., K. BATTMER, M. CASTOLDI, B. SCHULTHEIS, A. HOCHHAUS, M. U. MUCKENTHALER, A. GANSER, M. EDER und M. SCHERR: *Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells*. Blood, 109(10):4399–4405, May 2007.
- [32] HE, L., J. M. THOMSON, M. T. HEMANN, E. HERNANDO-MONGE, D. MU, S. GOODSON, S. POWERS, C. CORDON-CARDO, S. W. LOWE, G. J. HANNON und S. M. HAMMOND: *A microRNA polycistron as a potential human oncogene*. Nature, 435(7043):828–833, Jun 2005.
- [33] RAJEWSKI, N.: *microRNA target predictions in animals*. Nature Genetics, 38:S8–S13, 2006.
- [34] MIRANDA, K. C., T. HUYNH, Y. TAY, Y-S. ANG, W-L. TAM, A. M. THOMSON, B. LIM und I. RIGOUTSOS: *A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes*. Cell, 126(6):1203–1217, Sep 2006.
- [35] BRECKPOT, K., J. L. AERTS und K. THIELEMANS: *Lentiviral vectors for cancer immunotherapy: transforming infectious particles into therapeutics*. Gene Ther, 14(11):847–862, Jun 2007.
- [36] HOFFMANN, A. V., J. E. PETIT und P. A. H. MOSS: *Grundkurs Hämatologie*. Blackwell Verlag, 2003.
- [37] DOGAN, Y.: *Entwicklung bifunktionaler retroviraler Vektoren zur Untersuchung der Pathogenese myeloischer Systemerkrankungen und zur Evaluierung therapeutischer Zielstrukturen*. Doktorarbeit, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2008.
- [38] DÖHNER, H.: *Implication of the molecular characterization of acute myeloid leukemia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 1:412–419, 2007.

- [39] ELAGIB, K. E. und A. N. GOLDFARB: *Oncogenic pathways of AML1-ETO in acute myeloid leukemia: multifaceted manipulation of marrow maturation*. *Cancer Lett*, 251(2):179–186, Jun 2007.
- [40] SABATINI, D. M., H. ERDJUMENT-BROMAGE, M. LUI, P. TEMPST und S. H. SNYDER: *RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs*. *Cell*, 78(1):35–43, Jul 1994.
- [41] BROWN, E. J., M. W. ALBERS, T. B. SHIN, K. ICHIKAWA, C. T. KEITH, W. S. LANE und S. L. SCHREIBER: *A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex*. *Nature*, 369(6483):756–758, Jun 1994.
- [42] HAY, N. und N. SONENBERG: *Upstream and downstream of mTOR*. *Genes Dev*, 18(16):1926–1945, Aug 2004.
- [43] O'REILLY, K. E., F. ROJO, Q-B. SHE, D. SOLIT, G. B. MILLS, D. SMITH, H. LANE, F. HOFMANN, D. J. HICKLIN, D. L. LUDWIG, J. BASELGA und N. ROSEN: *mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt*. *Cancer Res*, 66(3):1500–1508, Feb 2006.
- [44] JOZWIAK, J., S. JOZWIAK, T. GRZELA und M. LAZARCZYK: *Positive and negative regulation of TSC2 activity and its effects on downstream effectors of the mTOR pathway*. *Neuromolecular Med*, 7(4):287–296, 2005.
- [45] AVILA-FLORES, A., T. SANTOS, E. RINCÓN und I. MÉRIDA: *Modulation of the mammalian target of rapamycin pathway by diacylglycerol kinase-produced phosphatidic acid*. *J Biol Chem*, 280(11):10091–10099, Mar 2005.
- [46] CORRADETTI, M. N. und K-L. GUAN: *Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR?* *Oncogene*, 25(48):6347–6360, Oct 2006.
- [47] SHAW, R. J. und L. C. CANTLEY: *Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth*. *Nature*, 441(7092):424–430, May 2006.
- [48] GUERTIN, D. A. und D. M. SABATINI: *The pharmacology of mTOR inhibition*. *Sci Signal*, 2(67):pe24, 2009.
- [49] PARK, S., N. CHAPUIS, J. TAMBURINI, V. BARDET, P. CORNILLET-LEFEBVRE, L. WILLEMS, A. GREEN, P. MAYEUX, C. LACOMBE und D. BOUSCARY: *Role of the PI3K/AKT and mTOR signalling pathways in acute myeloid leukemia*. *Haematologica*, Nov 2009.

- [50] NAVÉ, B. T., M. OUWENS, D. J. WITHERS, D. R. ALESSI und P. R. SHEPHERD: *Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation.* Biochem J, 344 Pt 2:427–431, Dec 1999.
- [51] HAAR, E. VANDER, S-I. LEE, S. BANDHAKAVI, T. J. GRIFFIN und D-H. KIM: *Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40.* Nat Cell Biol, 9(3):316–323, Mar 2007.
- [52] PULLEN, N. und G. THOMAS: *The modular phosphorylation and activation of p70s6k.* FEBS Lett, 410(1):78–82, Jun 1997.
- [53] TAMBURINI, J., N. CHAPUIS, V. BARDET, S. PARK, P. SUJOBERT, L. WILLEMS, N. IFRAH, F. DREYFUS, P. MAYEUX, C. LACOMBE und D. BOUSCARY: *Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin-like growth factor-1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways.* Blood, 111(1):379–382, Jan 2008.
- [54] STEELMAN, L. S., S. L. ABRAMS, J. WHELAN, F. E. BERTRAND, D. E. LUDWIG, J. BÄSECKE, M. LIBRA, F. STIVALA, M. MILELLA, A. TAFURI, P. LUNGHI, A. BONATI, A. M. MARTELLI und J. A. MCCUBREY: *Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia.* Leukemia, 22(4):686–707, Apr 2008.
- [55] KORNBLOU, S. M., M. WOMBLE, Y. H. QIU, C. E. JACKSON, W. CHEN, M. KONOPLEVA, E. H. ESTEY und M. ANDREEFF: *Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia.* Blood, 108(7):2358–2365, Oct 2006.
- [56] GRANDAGE, V. L., R. E. GALE, D. C. LINCH und A. KHWAJA: *PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kappaB, Mapkinase and p53 pathways.* Leukemia, 19(4):586–594, Apr 2005.
- [57] ZENG, Z., D. D. SARBASSOV, I. J. SAMUDIO, K. W. L. YEE, M. F. MUNSELL, C. E. JACKSON, F. J. GILES, D. M. SABATINI, M. ANDREEFF und M. KONOPLEVA: *Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML.* Blood, 109(8):3509–3512, Apr 2007.

- [58] TAMBURINI, J., A. S. GREEN, V. BARDET, N. CHAPUIS, S. PARK, L. WILLEMS, M. UZUNOV, N. IFRAH, F. DREYFUS, C. LACOMBE, P. MAYEUX und D. BOUSCARY: *Protein synthesis is resistant to rapamycin and constitutes a promising therapeutic target in acute myeloid leukemia*. *Blood*, 114(8):1618–1627, Aug 2009.
- [59] SANTOS, C. D., C. DEMUR, V. BARDET, N. PRADE-HOUELLIER, B. PAYRASTRE und C. RÉCHER: *A critical role for Lyn in acute myeloid leukemia*. *Blood*, 111(4):2269–2279, Feb 2008.
- [60] YUAN, R., A. KAY, W. J. BERG und D. LEBWOHL: *Targeting tumorigenesis: development and use of mTOR inhibitors in cancer therapy*. *J Hematol Oncol*, 2:45, 2009.
- [61] MARTEL, R. R., J. KLICIUS und S. GALET: *Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic*. *Can J Physiol Pharmacol*, 55(1):48–51, Feb 1977.
- [62] SEHGAL, S. N.: *Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression*. *Clin Biochem*, 31(5):335–340, Jul 1998.
- [63] SABATINI, D. M., B. A. PIERCHALA, R. K. BARROW, M. J. SCHELL und S. H. SNYDER: *The rapamycin and FKBP12 target (RAFT) displays phosphatidylinositol 4-kinase activity*. *J Biol Chem*, 270(36):20875–20878, Sep 1995.
- [64] OSHIRO, N., K-I. YOSHINO, S. HIDAYAT, C. TOKUNAGA, K. HARA, S. EGUCHI, J. AVRUCH und K. YONEZAWA: *Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function*. *Genes Cells*, 9(4):359–366, Apr 2004.
- [65] PARK, S., N. CHAPUIS, V. BARDET, J. TAMBURINI, N. GALLAY, L. WILLEMS, Z. A. KNIGHT, K. M. SHOKAT, N. AZAR, F. VIGUIÉ, N. IFRAH, F. DREYFUS, P. MAYEUX, C. LACOMBE und D. BOUSCARY: *PI-103, a dual inhibitor of Class IA phosphatidylinositide 3-kinase and mTOR, has antileukemic activity in AML*. *Leukemia*, 22(9):1698–1706, Sep 2008.
- [66] SCHERR, M., L. VENTURINI, KARIN BATTMER, M. SCHALLER-SCHOENITZ, D. SCHAEFER, I. DALLMANN, A. GANSER und M. EDER: *Lentivirus-mediated*

- antagomir expression for specific inhibition of miRNA function*. Nucleic Acids Res, 35(22):e149, 2007.
- [67] GRAHAM, F. L., J. SMILEY, W. C. RUSSELL und R. NAIRN: *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 36(1):59–74, Jul 1977.
- [68] MEYER, J., M. RHEIN, B. SCHIEDLMEIER, O. KUSTIKOVA, C. RUDOLPH, K. KAMINO, T. NEUMANN, M. YANG, A. WAHLERS, B. FEHSE, G. W. REUTHER, B. SCHLEGELBERGER, A. GANSER, C. BAUM und Z. LI: *Remarkable leukemogenic potency and quality of a constitutively active neurotrophin receptor, deltaTrkA*. Leukemia, 21(10):2171–2180, Oct 2007.
- [69] NAKABAYASHI, H., K. TAKETA, K. MIYANO, T. YAMANE und J. SATO: *Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium*. Cancer Res, 42(9):3858–3863, Sep 1982.
- [70] LOZZIO, C. B. und B. B. LOZZIO: *Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome*. Blood, 45(3):321–334, Mar 1975.
- [71] ASOU, H., S. TASHIRO, K. HAMAMOTO, A. OTSUJI, K. KITA und N. KAMADA: *Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation*. Blood, 77(9):2031–2036, May 1991.
- [72] SUNDSTRÖM, C. und K. NILSSON: *Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)*. Int J Cancer, 17(5):565–577, May 1976.
- [73] WARNER, N. L., M. A. MOORE und D. METCALF: *A transplantable myelomonocytic leukemia in BALB-c mice: cytology, karyotype, and muramidase content*. J Natl Cancer Inst, 43(4):963–982, Oct 1969.
- [74] ROBERTS, P.: *MicroRNA expression profiling on arrays enhanced with locked nucleic acids*. Nature Methods, 3:iii–iv, 2006.
- [75] CASTOLDI, M., S. SCHMIDT, V. BENES, M. NOERHOLM, A. E. KULOZIK, M. W. HENTZE und M. U. MUCKENTHALER: *A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA)*. RNA, 12(5):913–920, May 2006.
- [76] CAMPBELL, N. A.: *Biologie*. Spektrum Akad. Vlg., Hdg., 1997.

- [77] WATSON, J. D., M. GILMAN, J. WITKOWSKI und M. ZOLLER: *Recombinant DNA*. Scientific American Books, 2 Auflage, 1992.
- [78] APPLIED BIOSYSTEMS: *TaqMan® Small RNA Assays*, 2009.
- [79] CHEN, C., K. K. McDONALD, A. H. WONG, O. V. PETRAUKENE und M. R. FURTADO: *Real-Time PCR for RNAi and MicroRNA Applications*. Focus On: Gene Silencing using RNAi, 1:S10–S13, 2005.
- [80] SCHMITTGEN, T. D. und K. J. LIVAK: *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. Nat Protoc, 3(6):1101–1108, 2008.
- [81] SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH und T. MANIATIS: *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [82] CHANG, K., S. J. ELLEDGE und G. J. HANNON: *Lessons from Nature: microRNA-based shRNA libraries*. Nat Methods, 3(9):707–714, Sep 2006.
- [83] STEGMEIER, F., G. HU, R. J. RICKLES, G. J. HANNON und S. J. ELLEDGE: *A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 102(37):13212–13217, Sep 2005.
- [84] MADIGAN, M. T., J. M. MARTIN und J. PARKER: *Brock Mikrobiologie*. Spektrum Akad. Vlg., Hdg., 2001.
- [85] QIAGEN: *QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook*, 2007.
- [86] GANTEN, D. und K. RUCKPAUL: *Grundlagen der Molekularen Medizin*. Springer Medizin Verlag, 2008.
- [87] NISHIOKA, C., T. IKEZOE, J. YANG, H. P. KOEFFLER und A. YOKOYAMA: *Blockade of mTOR signaling potentiates the ability of histone deacetylase inhibitor to induce growth arrest and differentiation of acute myelogenous leukemia cells*. Leukemia, 22(12):2159–2168, Dec 2008.
- [88] SASAKI, K., T. YAMAGATA und K. MITANI: *Histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid circumvent apoptosis in human leukemic cells expressing the RUNX1 chimera*. Cancer Sci, 99(2):414–422, Feb 2008.
- [89] A. PINGOUD, C. URBANKE: *Arbeitsmethoden der Biochemie*. De-Gryter Lehrbuch, 1997.

- [90] SCHÄGGER, H.: *Tricine-SDS-PAGE*. Nat Protoc, 1(1):16–22, 2006.
- [91] TOWBIN, H., T. STAЕHELIN und J. GORDON: *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 76(9):4350–4354, Sep 1979.
- [92] TIMISCHL, W.: *Biostatistik*. Springer, 2000.
- [93] HECKER, H.: *Auswahl, Anwendung und Interpretation statistischer Tests*. Technischer Bericht, Medizinische Hochschule Hannover, 1997.
- [94] HOCHBERG, Y. und Y. BENJAMINI: *More powerful procedures for multiple significance testing*. Statistics in Medicine, 7:811–818, 1990.
- [95] LI, Q-J., J. CHAU, P. J. R. EBERT, G. SYLVESTER, H. MIN, G. LIU, R. BRAICH, M. MANOHARAN, J. SOUTSCHEK, P. SKARE, L. O. KLEIN, M. M. DAVIS und C-Z. CHEN: *miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection*. Cell, 129(1):147–161, Apr 2007.
- [96] CHI, S. W., J. B. ZANG, A. MELE und R. B. DARNELL: *Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps*. Nature, 460(7254):479–486, Jul 2009.
- [97] ZHANG, L-H. und F-R. LIN: *[Effect of rapamycin on leukemia cell lines]*. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 17(4):870–873, Aug 2009.
- [98] HEUER, M., T. BENKÖ, V. R. CICINNATI, G. M. KAISER, G. C. SOTIROPOULOS, H. A. BABA, J. W. TRECKMANN, C. E. BROELSCH und A. PAUL: *Effect of low-dose rapamycin on tumor growth in two human hepatocellular cancer cell lines*. Transplant Proc, 41(1):359–365, 2009.
- [99] GEORGANTAS, R. W., R. HILDRETH, S. MORISOT, J. ALDER, C-G. LIU, S.HEIMFELD, G. A . CALIN, C. M. CROCE und C. I. CIVIN: *CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control*. Proc Natl Acad Sci U S A, 104(8):2750–2755, Feb 2007.
- [100] ZHAO, H., A. KALOTA, S. JIN und A. M. GEWIRTZ: *The c-myb proto-oncogene and microRNA-15a comprise an active autoregulatory feedback loop in human hematopoietic cells*. Blood, 113(3):505–516, Jan 2009.
- [101] XIAO, C., D. P. CALADO, G. GALLER, T-H. THAI, H. C. PATTERSON, J. WANG, N. RAJEWSKY, T. P. BENDER und K. RAJEWSKY: *MiR-150 controls B cell dif-*

- ferentiation by targeting the transcription factor c-Myb.* Cell, 131(1):146–159, Oct 2007.
- [102] ZHOU, BE., S. WANG, C. MAYR, D. P. BARTEL und H. F. LODISH: *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(17):7080–7085, Apr 2007.
- [103] BANSAL, D., C. SCHOLL, S. FRÖHLING, E. MCDOWELL, B. H. LEE, K. DÖHNER, P. ERNST, A. J. DAVIDSON, G. Q. DALEY, L. I ZON, D. G. GILLILAND und B. J. P. HUNTLY: *Cdx4 dysregulates Hox gene expression and generates acute myeloid leukemia alone and in cooperation with Meis1a in a murine model.* Proc Natl Acad Sci U S A, 103(45):16924–16929, Nov 2006.
- [104] SAUVAGEAU, G., P. M. LANSDORP, C. J. EAVES, D. E. HOGGE, W. H. DRAGOWSKA, D. S. REID, C. LARGMAN, H. J. LAWRENCE und R. K. HUMPHRIES: *Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 91(25):12223–12227, Dec 1994.
- [105] VALK, P. J. M., R. G. W. VERHAAK, M. A. BEIJEN, C. A. J. ERPELINCK, S. B. VAN WAALWIJK VAN DOORN-KHOSROVANI, J. M. BOER, H. B. BEVERLOO, M. J. MOORHOUSE, P. J. VAN DER SPEK, B. LÖWENBERG und R. DELWEL: *Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia.* N Engl J Med, 350(16):1617–1628, Apr 2004.
- [106] GARZON, R., F. PICHIORRI, T. PALUMBO, R. IULIANO, A. CIMMINO, R. AQEILAN, S. VOLINIA, D. BHATT, H. ALDER, G. MARCUCCI, G. A. CALIN, C-G. LIU, C. D. BLOOMFIELD, M. ANDREEFF und C. M. CROCE: *MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 103(13):5078–5083, Mar 2006.
- [107] JONGEN-LAVRENCIC, M., S. M. SUN, M. K. DIJKSTRA, P. J. M. VALK und B. LÖWENBERG: *MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia.* Blood, 111(10):5078–5085, May 2008.
- [108] FELLI, N., L. FONTANA, E. PELOSI, R. BOTTA, D. BONCI, F. FACCHIANO, F. LIUZZI, V. LULLI, O. MORSILLI, S. SANTORO, M. VALTIERI, G. A. CALIN, C-G. LIU, A. SORRENTINO, C. M. CROCE und C. PESCHLE: *MicroRNAs 221 and*

- 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 102(50):18081–18086, Dec 2005.
- [109] ISKEN, F., B. STEFFEN, S. MERK, M. DUGAS, B. MARKUS, N. TIDOW, M. ZÜHLSDORF, T. ILLMER, C. THIEDE, W. E. BERDEL, H. SERVE und C. MÜLLER-TIDOW: *Identification of acute myeloid leukaemia associated microRNA expression patterns.* Br J Haematol, 140(2):153–161, Jan 2008.
- [110] CHEN, C-Z., L. LI, H. F. LODISH und D. P. BARTEL: *MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation.* Science, 303(5654):83–86, Jan 2004.
- [111] FABBRI, M., R. GARZON, M. ANDREEFF, H. M. KANTARJIAN, G. GARCIA-MANERO und G. A. CALIN: *MicroRNAs and noncoding RNAs in hematological malignancies: molecular, clinical and therapeutic implications.* Leukemia, 22(6):1095–1105, Jun 2008.
- [112] NERVI, C., F. FAZI und F. GRIGNANI: *Oncoproteins, heterochromatin silencing and microRNAs: a new link for leukemogenesis.* Epigenetics, 3(1):1–4, 2008.
- [113] DEBERNARDI, S., S. SKOULAKIS, G. MOLLOY, T. CHAPLIN, A. DIXON-MCIVER und B. D. YOUNG: *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(5):912–916, May 2007.
- [114] DIXON-MCIVER, A., P. EAST, C. A. MEIN, J-B. CAZIER, G. MOLLOY, T. CHAPLIN, T. A. LISTER, B. D. YOUNG und S. DEBERNARDI: *Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia.* PLoS One, 3(5):e2141, 2008.
- [115] MOTT, J. L., S. KOBAYASHI, S. F. BRONK und G. J. GORES: *mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis.* Oncogene, 26(42):6133–6140, Sep 2007.
- [116] PEKARSKY, Y., U. SANTANAM, A. CIMMINO, A. PALAMARCHUK, A. EFANOV, V. MAXIMOV, S. VOLINIA, H. ALDER, C-G. LIU, L. RASSENTI, G. A. CALIN, J. P. HAGAN, T. KIPPS und C. M. CROCE: *Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181.* Cancer Res, 66(24):11590–11593, Dec 2006.
- [117] LI, Z., J. LU, M. SUN, S. MI, H. ZHANG, R. T. LUO, P. CHEN, Y. WANG, M. YAN, Z. QIAN, M. B. NEILLY, J. J., Y. ZHANG, S. K. BOHLANDER, D-E

- ZHANG, R. A. LARSON, M. M. LE BEAU, M. J. THIRMAN, T. R. GOLUB, J. D. ROWLEY und J. CHEN: *Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 105(40):15535–15540, Oct 2008.
- [118] MARCUCCI, G., M. D. RADMACHER, K. MAHARRY, K. MRÓZEK, A. S. RUPPERT, P. PASCHKA, T. VUKOSAVLJEVIC, S. P. WHITMAN, C. D. BALDUS, C. LANGER, C-G. LIU, A. J. CARROLL, B. L. POWELL, R. GARZON, C. M. CROCE, J. E. KOLITZ, M. A. CALIGIURI, R. A. LARSON und C. D. BLOOMFIELD: *MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 358(18):1919–1928, May 2008.
- [119] GARZON, R., S. VOLINIA, C-G. LIU, C. FERNANDEZ-CYMERING, T. PALUMBO, F. PICHIORRI, M. FABBRI, K. COOMBES, H. ALDER, T. NAKAMURA, N. FLOMENBERG, G. MARCUCCI, G. A. CALIN, S. M. KORNBLAU, H. KANTARJIAN, C.D. BLOOMFIELD, M. ANDREEFF und C. M. CROCE: *MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia*. Blood, 111(6):3183–3189, Mar 2008.
- [120] GENTILE, M., K. OLSEN, M. DUFMATS und S. WINGREN: *Frequent allelic losses at 11q24.1-q25 in young women with breast cancer: association with poor survival*. Br J Cancer, 80(5-6):843–849, May 1999.
- [121] BERNARD, O. A. und R. BERGER: *Molecular basis of 11q23 rearrangements in hematopoietic malignant proliferations*. Genes Chromosomes Cancer, 13(2):75–85, Jun 1995.
- [122] VARNHOLT, H., U. DREBBER, F. SCHULZE, I. WEDEMEYER, P. SCHIRMACHER, H-P. DIENES und M. ODENTHAL: *MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 47(4):1223–1232, Apr 2008.
- [123] NAM, E. J., H.I YOON, S. W. KIM, H. KIM, Y. T. KIM, J. H. KIM, J. W. KIM und S. KIM: *MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma*. Clin Cancer Res, 14(9):2690–2695, May 2008.
- [124] YANG, H., W. KONG, L. HE, J-J. ZHAO, J. D. O'DONNELL, J. WANG, R. M. WENHAM, D. COPPOLA, P. A. KRUK, S. V. NICOSIA und J. Q. CHENG: *MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN*. Cancer Res, 68(2):425–433, Jan 2008.

- [125] HENSON, B. J., S. BHATTACHARJEE, D. M. O'DEE, E. FEINGOLD und S. M. GOLLIN: *Decreased expression of miR-125b and miR-100 in oral cancer cells contributes to malignancy*. Genes Chromosomes Cancer, 48(7):569–582, Jul 2009.
- [126] ZHANG, H., X-Q LUO, P. ZHANG, L-B. HUANG, Y-S. ZHENG, J. WU, H. ZHOU, L-H. QU, L. XU und Y-Q. CHEN: *MicroRNA patterns associated with clinical prognostic parameters and CNS relapse prediction in pediatric acute leukemia*. PLoS One, 4(11):e7826, 2009.
- [127] CHRISTODOULOU, F., F. RAIBLE, R. TOMER, O. SIMAKOV, K. TRACHANA, S. KLAUS, H. SNYMAN, G.J HANNON, P. BORK und D. ARENDT: *Ancient animal microRNAs and the evolution of tissue identity*. Nature, 463(7284):1084–1088, Feb 2010.
- [128] WANG, Y., S. JURANEK, H. LI, G. SHENG, T. TUSCHL und D. J. PATEL: *Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex*. Nature, 456(7224):921–926, Dec 2008.
- [129] BRENNECKE, J., A. STARK, R. B. RUSSELL und S. M. COHEN: *Principles of microRNA-target recognition*. PLoS Biol, 3(3):e85, Mar 2005.
- [130] WANG, F-Z., F. WEBER, C. CROCE, C-G. LIU, X. LIAO und P. E. PELLETT: *Human cytomegalovirus infection alters the expression of cellular microRNA species that affect its replication*. J Virol, 82(18):9065–9074, Sep 2008.
- [131] NAGARAJA, A. K., C. J. CREIGHTON, Z. YU, H. ZHU, P. H. GUNARATNE, J. G. REID, E. OLOKPA, H. ITAMOCHI, N. T. UENO, S. M. HAWKINS, M. L. ANDERSON und M. M. MATZUK: *A link between mir-100 and FRAP1/mTOR in clear cell ovarian cancer*. Mol Endocrinol, 24(2):447–463, Feb 2010.
- [132] SANDHU, M. S.: *Insulin-like growth factor-I and risk of type 2 diabetes and coronary heart disease: molecular epidemiology*. Endocr Dev, 9:44–54, 2005.
- [133] TOVAR, V., C. ALSINET, A. VILLANUEVA, Y. HOSHIDA, D. Y. CHIANG, M. SOLÉ, S. THUNG, S. MOYANO, S. TOFFANIN, B. MÍNGUEZ, L. CABELLOS, J. PEIX, M. SCHWARTZ, V. MAZZAFERRO, J. BRUIX und J. M. LLOVET: *IGF activation in a molecular subclass of hepatocellular carcinoma and pre-clinical efficacy of IGF-1R blockage*. J Hepatol, 52(4):550–559, Apr 2010.

- [134] FOX, C. J., P. S. HAMMERMAN, R. M. CINALLI, S. R. MASTER, L. A. CHODOSH und C. B. THOMPSON: *The serine/threonine kinase Pim-2 is a transcriptionally regulated apoptotic inhibitor*. Genes Dev, 17(15):1841–1854, Aug 2003.

A. Lebenslauf, Publikationsliste, Erklärung zur Dissertation

Lebenslauf

Name: Stephanie Brundiars
geboren in: Lönigen, Deutschland
geboren am: 23. März 1983

Schulabschluss: Abitur am Copernicus Gymnasium Lönigen, Jahrgang 2002

Studium: 2002 bis 2007 Studium der Biotechnologie, binational (Diplom-Ingenieur (FH)) an der Fachhochschule Oldenburg/Ostfriesland/Wilhelmshaven und Hanzehogeschool Groningen

Diplomarbeit: 2007 in der Abteilung Hämatologie, Hämostaseologie, Onkologie und Stammzelltransplantation, MHH;
Titel: „Expression Profiles of microRNAs in Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines “

Doktorandenstelle: seit 2007 als wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Hämatologie, Hämostaseologie, Onkologie und Stammzelltransplantation, MHH

Publikationsliste

S BRUNDIERS, K BATTMER, M BRUGMAN, M CASTOLDI, J KRAUTER, M MUCK-ENTHALER, A GANSER, M EDER, M SCHERR *miRNA expression in acute myeloid leukemia cells with different karyotype*, 13th Congress of the European Hematology Association 2008, Kopenhagen, Dänemark. Posterpräsentation

Danksagungen

Viele Menschen unterstützten mich während meiner Zeit am Institut für Hämatologie, Hämostaseologie, Onkologie und Stammzelltransplantation an der Medizinischen Hochschule Hannover bei der Erstellung dieser Dissertation.

Besonderer Dank gilt vor allem Prof. Michaela Scherr und Prof. Matthias Eder, sowie Dr. Letizia Venturini für die Betreuung während der Dissertation. Ihre Kritik, Anregungen und Hilfe haben mir immer wieder bei auftretenden Problemen geholfen.

Für die Hilfe mit allen L^AT_EX-Problemen möchte ich mich bei Sylvia Borchers bedanken. Das Programm *OTTO* entstand in Zusammenarbeit mit Philip Heinzelmann.

Dann möchte ich natürlich all meinen lieben Kollegen aus dem Labor für das schöne Arbeitsklima danken. Iris danke ich vor allem für jegliche Unterstützung und Hilfe. Ich danke Karin dafür, dass sie ihr Sorgenkind immer so gut beraten hat. Meinen lieben Mit-Doktoranden möchte ich für die netten Abende und Diskussionen danken. Bei Michael möchte ich mich für die vielen Stunden beim Kaffee und spannenden Diskussionen bedanken. Dem Klonkrieger Daniel, und auch Yildirim möchte ich für viele gute Tipps danken. Und natürlich möchte ich mich bei Ewa und Johanna für die super nette Büroathmosphäre bedanken.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken. Meinen Eltern möchte ich für die unbegrenzte Unterstützung und den Rückhalt danken, den sie mir während der ganzen Zeit gegeben haben. Ebenso möchte ich mich bei meiner Oma bedanken, die immer um mein Wohlergehen besorgt war. Meinen beiden wunderbaren Schwestern Anne und Maria möchte ich ganz besonders dafür danken, dass sie einfach immer für mich da waren. Gleiches gilt für meinen Partner Florian, der mich immer wieder motiviert und so sehr unterstützt hat.

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „miRNA Expression bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) und funktionelle Analyse der miR-100“ selbstständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 17.05.2010

Stephanie Brundiars
