

Immunregulation der Stammzellnische in Myelodysplastischen Neoplasien – die besondere Rolle von mikroRNAs

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät I -
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Andrea Kindermann

1. Gutachter: Herr Dr. rer. nat. habil. Stephan König
2. Gutachterin: Frau Prof. Dr. med. Heike Kielstein
3. Gutachterin: Frau Prof. Dr. rer. nat. Monika Brunner-Weinzierl

Tag der Verteidigung: 22. Mai 2025

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Andrea Kindermann

I. Abkürzungsverzeichnis

AGO2	Argonaut-2
AK	Antikörper
alloHCT	<i>allogenic hematopoietic stem cell transplantation</i>
AML	akute myeloische Leukämie
ATRA	all-trans-Retinsäure
B-ALL	B-Zell akute lymphatische Leukämie
BCP	<i>B-cell precursor</i>
BM-MNC	<i>bone marrow mononuclear cells</i>
BSA	bovines Serumalbumin
B7.1/B7.2	Lymphozyten-Aktivierungsantigen CD80/CD86
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK4	<i>cyclin dependent kinase 4</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucelic acid</i>
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CILCP	<i>common innate lymphoid cell precursor</i>
CLP	<i>common lymphoid progenitor</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucelic acid</i>
E2F3	<i>E2F Transcription Factor 3</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Edu	Ethynyl-2'-deoxyuridin
Erk1/2	<i>extracellular-signal regulated kinase1/2</i>
EtOH	Ethanol
ETP	<i>early t-cell precursor</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FcR	Fc-Rezeptor
FHRB	<i>Finnish Hematology Registry and Clinical Biobank</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
G1-Phase	Gap-1-Phase
G2-M-Phase	Gap-2-Mitose-Phase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GvHD	<i>Graft-versus-Host-Disease</i>
Gy	Gray
HLA	humanes Leukozytenantigen
HMA	hypomethylierende Substanz
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i>
IFN γ	Interferon γ
IL-2	Interleukin-2
ILC	<i>innate lymphoid cell</i>
IPSS_R	<i>International Prognostic Scoring System_revised</i>
KS	Körperspender
LAMP-1	Lysosomal-assoziiertes Membranprotein 1
LMP	<i>lymphoid-myeloid progenitor</i>
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>
MDS	myelodysplastische Neoplasien
MFI	<i>median fluorescence intensity</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NF κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NKP	<i>natural killer cell progenitor</i>
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NM	nicht-MDS
PAMP	<i>pathogen-associated recognition pattern</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD-1	<i>programmed death cell protein</i>
PD-L1/PD-L2	<i>programmed cell death ligand-1/2</i>
PHA	Phythämagglutinin
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMAr	Phorbol-12-myristat-13-acetat <i>resting</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PTTG1	<i>pituitary tumor-transforming gene 1</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNU48	<i>small nucleolar RNA RNU48</i>
SF3B1	<i>splicing factor 3B subunit 1</i>

S-Phase	Synthese-Phase
SSC	<i>sideward scatter</i>
sub-G1-Phase	sub-Gap-1-Phase
Tc1	<i>Type 1 CD8⁺ T cells</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TP-53	Tumor Protein P53
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
VitD ₃	VitaminD ₃
WHO	<i>World Health Organisation</i>

II. Kurzfassung

Myelodysplastische Neoplasien (MDS) sind eine Gruppe von hämatopoetischen Stammzellerkrankungen, wobei die Patient*innen an einer gestörten Blutzellbildung aller Blutzellklassen leiden. Die pathophysiologischen Ursachen der MDS sind divers und umfassen unter anderem Veränderungen in der hämatopoetischen Stammzellumgebung, der sogenannten Stammzellnische, aber auch epigenetische Modifikationen [1, 2]. Das Immunsystem bildet mit den Zellen der angeborenen und erworbenen Immunität einen Teil dieser Stammzellnische [3]. Dass speziell T-Zellen mit ihren Signalwegen in dieser Nische einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Hämatopoese liefern ist bereits bekannt [4]. Der Einfluss von T-Zellen auf den Krankheitsausbruch bzw. -progress der MDS ist jedoch noch weitgehend unverstanden.

MikroRNAs, kurze nicht kodierende RNA Moleküle, sind wichtige Feinregulatoren fundamentaler zellbiologischer Prozesse wie z.B. Apoptose oder Proliferation [5]. Eine Dysregulation der mikroRNAs ist mit den unterschiedlichsten Krebsformen assoziiert, wodurch sie ein interessantes Therapieziel darstellen [6].

Die in dieser Arbeit untersuchten, in MDS differentiell exprimierten, mikroRNAs miR-34a, miR-143 und miR-181b haben nach Überexpression in den hämatopoetischen Zelllinien MDS-L und THP-1 keinen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten dieser Vorläuferzellen. Einzig miR-34a-Überexpression in leukämischen THP-1-Zellen hemmt das Proliferationsverhalten dieser und ist in der Lage, diese Zellen in einen Zellzyklus-G1-Arrest zu bringen. Dieser G1-Arrest der THP-1-Zellen kann auch bei Überexpression von miR-15a und miR-150 beobachtet werden. Die speziell aus dem Knochenmark stammende MDS-Zelllinie MDS-L weist bei keiner der erfolgreich durchgeführten Überexpressionen signifikante Veränderungen auf.

Bisherige miRNA-Studien lassen keine zelltypspezifische Zuordnung der differenziell exprimierten mikroRNAs aus Knochenmarkaspiraten von MDS-Patient*innen zu [7, 8]. Untersuchungen zu mikroRNA-Zielstrukturen einzelner MDS-Zellpopulationen und zur Funktionalität in den Immunzellen der Stammzellnische bei MDS sind ebenfalls unterrepräsentiert. Durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente konnte ein für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen spezifisches mikroRNA-Expressionsprofil sowohl aus MDS- als auch aus nicht-MDS-Knochenmarkproben identifiziert werden. Anhand dieser Profile wurden die Kandidaten miR-1281, miR-1825 und miR-5571 hinsichtlich ihrer Funktionalität in primären T-Zellen untersucht. Sowohl die Proliferation als auch die zytotoxische Wirkung der untersuchten CD8⁺ T-Zellen offenbarten keine Beeinflussung durch die erfolgreiche Überexpression der drei genannten mikroRNAs.

III. Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	I
II. Kurzfassung.....	IV
III. Inhaltsverzeichnis	V
IV. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1. Das hämatopoetische System.....	1
1.1.1 Die Hämatopoese	1
1.1.2 Angeborenes und erworbenes Immunsystem	3
1.1.3 <i>Cluster of differentiation</i> – CD-Marker	4
1.1.4 Das MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-System – ein kurzer Überblick.....	4
1.1.5 CD8 ⁺ T-Zellen als ein Teil des erworbenen Immunsystems	5
1.1.6 Myelodysplastische Neoplasien	8
1.2. MikroRNAs.....	11
1.2.1 Prozessierung und Nomenklatur der mikroRNAs.....	11
1.2.2 Funktion der mikroRNAs – speziell in MDS	12
1.3. Zielstellung.....	14
2. Material.....	16
2.1. Chemikalien und Reagenzien	16
2.2. Lösungen.....	17
2.3. Geräte.....	17
2.4. Kits.....	18
2.5. Primer	18
2.6. Antikörper	20
2.7. MikroRNA- <i>mimics</i>	21
2.8. Zellen.....	21
2.9. Software.....	22
2.10. Sonstiges	22

2.11. Statistik	23
3. Methoden	24
3.1. Zellkultur – Zelllinien	24
3.1.1 Anzucht und Vermehrung der Zellen	24
3.1.2 Transfektion der Zelllinien.....	24
3.1.3 Differenzierungsassay der Zelllinien	25
3.1.4 Proliferationsanalyse der Zelllinien	26
3.1.5 Zellzyklusanalyse	27
3.2. Primärzellkultur – periphere Zellen.....	27
3.2.1 <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> (PBMC)-Isolation.....	27
3.2.2 Magnetische Sortierung primärer CD8 ⁺ T-Zellen.....	28
3.2.3 Transfektion primärer CD8 ⁺ T-Zellen	30
3.2.4 Kokultur zwischen CD8 ⁺ T-Zellen und hämatopoetischen Zelllinien.....	30
3.2.5 T-Zellproliferation.....	31
3.2.6 CD107a-Aktivierungsassay CD8 ⁺ T-Zellen	32
3.3. Antikörperfärbung für die durchflusszytometrische Analyse	32
3.4. Primärzellen – Knochenmarkzellen	33
3.4.1 Gewinnung der Knochenmarkzellen aus Körperspendern	33
3.4.2 Antikörperfärbung der Knochenmarkzellen für die Zellsortierung.....	33
3.4.3 MikroRNA-Microarray Analysen mittels <i>GeneChip™ miRNA 4.0 Array</i>	33
3.5. Molekularbiologische Methoden.....	34
3.5.1 RNA-Isolation mittels <i>NucleoSpin® miRNA-Kit</i>	34
3.5.2 RNA-Isolation mittels selbst hergestelltem Trizol	35
3.5.3 Reverse Transkription – cDNA-Synthese	35
3.5.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion.....	37
4. Ergebnisse.....	38
4.1. Analysen von in MDS differentiell exprimierten miRNAs in zellbiologischen Prozessen der Vorläuferzelllinien MDS-L und THP-1	38

4.1.1 Erfolgreiche transiente Überexpression ausgewählter mikroRNA-Kandidaten in den Zelllinien MDS-L und THP-1	38
4.1.2 Differenzierung von MDS-L und THP-1 mit ATRA und PMA, wobei auf VitD ₃ -Stimulation nur THP-1-Zellen reagieren	40
4.1.3 Der Einfluss von mikroRNA-Überexpression auf das Differenzierungsverhalten von THP-1 und MDS-L	46
4.1.4 Das Proliferationsverhalten von THP-1 und MDS-L nach mikroRNA-Überexpression	51
4.1.5 Beeinflussung des Zellzyklus der THP-1- und MDS-L-Zellen nach mikroRNA-Überexpression	52
4.2. Identifizierung von differentiell exprimierten mikroRNAs in isolierten T-Zellen aus humanen Knochenmarkproben von MDS-Patient*innen und nicht-MDS-Proband*innen ..	56
4.2.1 Die Zellsortierung von Knochenmarksproben	56
4.2.2 Vergleichende Expressionsanalyse mittels <i>Gene ChipTM miRNA 4.0 Array</i>	59
4.3. Zellfunktionsanalysen differentiell exprimierter mikroRNAs in primären humanen T-Zellen	61
4.3.1 Etablierung eines Kokulturmodells von CD8 ⁺ T-Zellen mit hämatopoetischen Leukämiezelllinien	61
4.3.2 Proliferation und Zytotoxizität von CD8 ⁺ T-Zellen nach transienter Überexpression ausgewählter mikroRNA-Kandidaten	65
5. Diskussion	70
5.1. Der Einfluss verschiedener in MDS differentiell exprimierter mikroRNAs auf biologische Prozesse in MDS-L- und THP-1-Zellen	70
5.1.1 Erfolgreiche THP-1 und MDS-L Differenzierung ohne eindeutige Beeinflussung durch mikroRNA-Überexpression	70
5.1.2 Verändertes Proliferationsverhalten der THP-1-Zellen nach miR-34a-Überexpression	73
5.1.3 Die Überexpression von miR-15a, miR-34a und miR-150 beeinflusst den Zellzyklus von THP-1-Zellen signifikant	74
5.2. Identifizierung und Einfluss von in MDS differentiell exprimierten mikroRNAs auf T-zelluläre Effektorfunktionen	76

5.2.1 Zelluläre Verteilungsmuster von Stammzellen und adulten T-Zellen in MDS- und nicht-MDS-Knochenmarkproben	76
5.2.2 Identifikation von 21 signifikant unterschiedlich exprimierten mikroRNAs in CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen von MDS-Knochenmarkproben	77
5.2.3 Etablierung einer T-Zellkokultur mit hämatopoetischen Zelllinien.....	78
5.2.4 Überexpression und Zellfunktionsanalysen von miR-1281, miR-1825 und miR-5571 in primären CD8 ⁺ T-Zellen	80
6. Zusammenfassung und Ausblick.....	81
V. Literaturverzeichnis	XII
VI. Anhang	XXVII
VII. Lebenslauf	
VIII. Publikationsliste.....	
IX. Danksagung	

IV. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Hämatopoese	1
Abb. 2: Schematische Darstellung der Aktivierung einer CD8 ⁺ T-Zelle (A) und die fünf möglichen daraus resultierenden Subtypen (B).	6
Tab. 1: Klassifikation von myelodysplastischen Neoplasien laut WHO (Stand 2022).	9
Abb. 3: Schematische Darstellung der mikroRNA-Prozessierungsschritte.....	11
Tab. 2: Verwendete Chemikalien/Reagenzien und deren Hersteller.	16
Tab. 3: Verwendete Lösungen und ihre Zusammensetzung.	17
Tab. 4: Verwendete Geräte.	17
Tab. 5: Verwendete Kits.	18
Tab. 6: Verwendete mikroRNA-Primer mit der entsprechenden Sequenz und der zugehörigen Produktgröße.	18
Tab. 7: Die hier verwendeten mikroRNA-Abkürzungen mit ihrer detaillierten Nomenklatur. ...	20
Tab. 8: Verwendete Primer mit den entsprechenden Sequenzen (<i>forward</i> [fwr] und <i>reverse</i> [rev]) und der zugehörigen Produktgröße.	20
Tab. 9: Verwendete Antikörper mit dem gebundenen Fluorochrom und dessen Hersteller. ...	20
Tab. 10: Verwendete mikroRNA- <i>mimics</i> und deren Hersteller.	21
Tab. 11: Verwendete Software und deren Hersteller.	22
Tab. 12: Verwendete Hilfsmittel und deren Hersteller.	22
Tab. 13: Die aus Konzentrationsreihen ermittelten zelllinienspezifischen Konzentrationen (c) der Differenzierungsreagenzien.	25
Tab. 14: Die Zusammensetzung des <i>Click-iT-Plus-reaction-cocktails</i>	26
Tab. 15: Pipettierschema der cDNA-Synthese mit <i>random hexamer primer</i>	35
Tab. 16: Pipettierschema der cDNA-Synthese mit miRNA-spezifischen <i>stem-loop primern</i> pro Ansatz.	36
Tab. 17: Thermozyklerprogramme der cDNA-Synthese mit (A) <i>random hexamer primer</i> bzw. (B) miRNA-spezifischen <i>stem-loop primern</i>	36
Tab. 18: Pipettierprotokolle der qPCR-Mastermixe für <i>random hexamer</i> bzw. <i>stem-loop</i> cDNA.	37
Tab. 19: qPCR-Programm.	37
Abb. 4: Überexpression der mikro-RNAs miR-143 (A), miR-150 (B) und miR-181b (C) in den Zelllinien MDS-L und THP-1.	39
Abb. 5: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression der Marker CD11b, CD11c, CD14 und CD86 ATRA- (A) bzw. PMA-stimulierter (B) MDS-L-	41
Abb. 6: RNA-Expressionsanalyse von CD11b, CD11c und PTTG1 ATRA- (A) bzw. PMA-stimulierter (B) MDS-L-Zellen.	42

Abb. 7: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression der Marker CD11b, CD11c, CD14 und CD86 ATRA- (A), PMAr- (B) bzw. VitD3-stimulierter (C) THP-1-Zellen. ...	43
Abb. 8: RNA-Expressionsanalyse von CD11b, CD11c und PTTG1 ATRA- (A), PMAr- (B) und VitD3-stimulierter (C) THP-1-Zellen.	45
Abb. 9: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression der Marker CD11b, CD11c, CD14 und CD86 transfizierter und anschließend ATRA- (A) bzw. PMA-stimulierter (B) MDS-L-Zellen.	46
Abb. 10: RNA-Expressionsanalyse der Marker CD11b und CD11c, sowie des Transkriptionsfaktors PTTG1 transfizierter und mit ATRA- (A) bzw. PMA-stimulierter (B) MDS-L-Zellen.	47
Abb. 11: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression der Marker CD11b, CD11c, CD14 und CD86 transfizierter und anschließend ATRA- (A), PMAr- (B) bzw. VitD3-stimulierter (C) THP-1-	48
Abb. 12: RNA-Expressionsanalyse der Marker CD11b und CD11c, sowie des Transkriptionsfaktors PTTG1 transfizierter und mit ATRA- (A), PMAr- (B) und VitD3-stimulierter (C) THP-1-Zellen.	50
Abb. 13: Anteil proliferierender MDS-L- (A) bzw. THP-1- (B) Zellen nach 48-stündiger Transfektion mit miR-34a, miR-143 bzw. miR-181b.....	51
Abb. 14: mRNA-Level von CDK4, E2F3 und c-MYC in MDS-L-(A) und THP-1-(B) Zellen nach 48-stündiger mikroRNA- <i>mimic</i> Transfektion.	52
Abb. 15: Repräsentative Darstellung einer Propidiumiodid-gefärbten Zellkulturprobe für die durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus	53
Abb. 16: Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse (A, B) und mRNA-Expressionsuntersuchung (C) transfizierter MDS-L-Zellen.	53
Abb. 17: Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse (A, B) und mRNA-Expressionsuntersuchung (C) transfizierter THP-1-Zellen.	54
Abb. 18: Angewendete <i>gating</i> -Strategie zur durchflusszytometrischen Sortierung von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen aus Knochenmarksproben verschiedenen Ursprungs.	56
Abb. 19: Prozentualer Anteil der CD34 ⁺ , CD117 ⁺ und CD34 ⁺ /CD117 ⁺ (A) bzw. der CD3 ⁺ (B) Zellen an CD45 ⁺ Zellen in den Körperspender-(KS), nicht-MDS- (NM) bzw. MDS-Proben nach durchflusszytometrischer Analyse.	57
Abb. 20: Prozentualer Anteil der CD4 ⁺ (A) bzw. der CD8 ⁺ (B) Zellen an CD3 ⁺ Zellen in den Körperspender-(KS), nicht-MDS- (NM) bzw. MDS-Proben nach durchflusszytometrischer Analyse.	58
Abb. 21: Signifikant differentiell exprimierte mikroRNAs der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen in MDS-Knochenmark.	59

Abb. 22: Repräsentative Darstellung CFSE-gefärbter Proben, sowohl proliferiert (rot) als auch nicht proliferiert (blau).....	62
Abb. 23: Prozentualer Anteil der proliferierten Zellen der Kontroll- und Kokulturproben.....	62
Abb. 24: Prozentualer Anteil der CD25 ⁺ (A), CD25 ⁺ /CD71 ⁺ (B) bzw. CD71 ⁺ Zellen (C) der proliferierten Zellen der Positiv- (stimuliert) und Negativkontrollen (nicht stimuliert), der MDS-L- Kokultur (KK) bzw. der THP-1- Kokultur.	64
Abb. 25: Überexpression der mikroRNAs miR-5571 (A), miR-1281 (B) und miR-1825 (C) in primären CD8 ⁺ T-Zellen.....	66
Abb. 26: Prozentualer Anteil der proliferierten Zellen der stimulierten bzw. nicht stimulierten transfizierten CD8 ⁺ T-Zellen.	66
Abb. 27: Prozentualer Anteil der CD71 ⁺ , CD25 ⁺ /CD71 ⁺ bzw. CD25 ⁺ Zellen der proliferierten (A) bzw. nicht proliferierten (B) transfizierten und stimulierten (Anti-CD3 und IL-2) CD8 ⁺ T-Zellen.	67
Abb. 28: Prozentualer Anteil der CD107a ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen unter Stimulation und in Kokultur mit MDS-L-Zellen	68
Abb. 29: Prozentualer Anteil der CD107a ⁺ miR-transfizierten CD8 ⁺ T-Zellen unter verschiedenen Konditionen im Vergleich zur miR-kontroll-transfizierten Probe.....	69

1. Einleitung

1.1. Das hämatopoetische System

1.1.1 Die Hämatopoese

Bereits um den 7. Tag der humanen Embryogenese beginnt die Blutzellentwicklung, die Hämatopoese, eines Organismus [9]. Dieser Prozess findet zunächst im embryonalen Dottersack und anschließend in der fetalen Leber statt, bevor er sich final nach der Geburt im Thymus und dem Knochenmark manifestiert [10, 11]. Während der embryonalen Hämatopoese unterscheidet man 2 Wellen, die primitive und die sich anschließende definitive Hämatopoese. In der ersten, nur ca. 48 Stunden dauernden, Welle tauchen erythroide und Makrophagenvorläuferzellen auf. Diese tragen zur Aufrechterhaltung und Entwicklung des Embryos bis zur zweiten Welle bei und verschwinden aber mit Einsetzen dieser wieder. Während der definitiven Hämatopoese wiederum entwickeln sich die erythroiden und myeloiden Vorläuferzellen, sowie die hämatopoetischen Stammzellen (HSC) [12]. Letztere sind für die lebenslang andauernde ständige Erneuerung der Blutzellen verantwortlich und sind in der Lage alle Subtypen der zirkulierenden Blutzellen hervorzubringen (Abb. 1) [13]. Am Ende spricht man von drei großen Blutzellpopulationen: die Erythrozyten, die Thrombozyten und die Leukozyten.

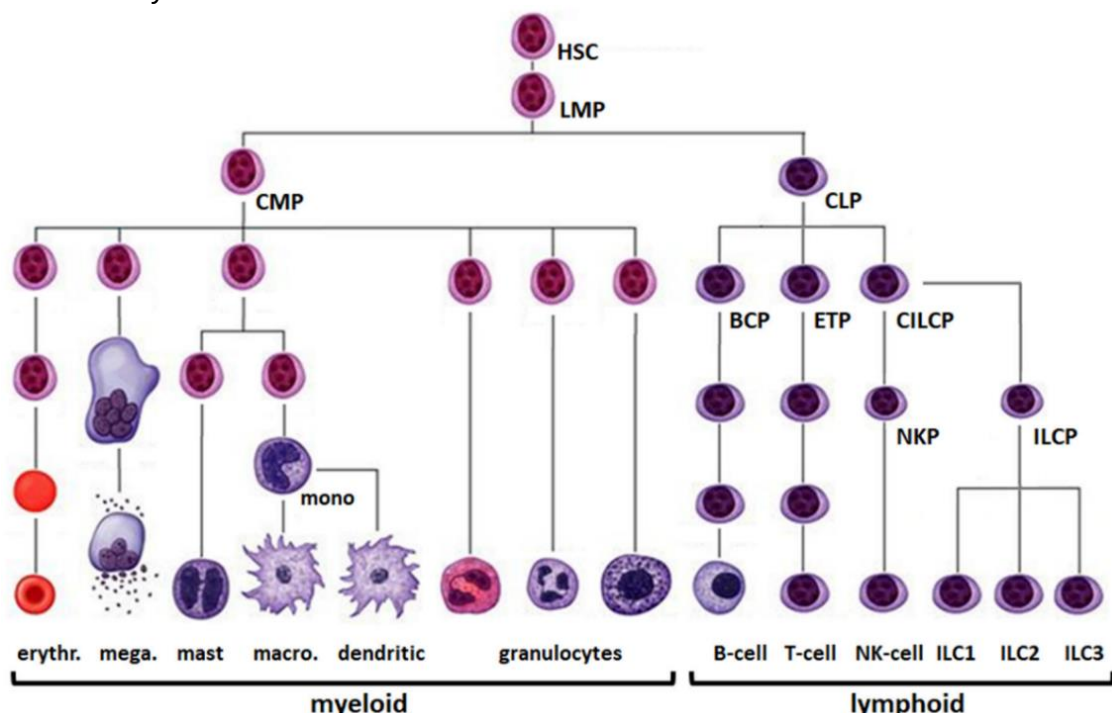


Abb. 1: Schematische Darstellung der Hämatopoese. Die Abbildung illustriert die Reifung der finalen Blutzellen ausgehend von der hämatopoetischen Stammzelle (HSC). Links ist die myeloide und rechts die lymphoide Abstammungsreihe skizziert. LMP- gemeinsamer lymphoider und myeloider Vorläufer; CMP- gemeinsamer myeloider Vorläufer; CLP- gemeinsamer lymphoider Vorläufer; BCP- B-Zellvorläufer; ETP- früher T-Zellvorläufer; CILCP- gemeinsamer Vorläufer angeborener lymphatischer Zellen; NKP- NK-Zellvorläufer; ILCP- lymphoide Vorläuferzellen des angeborenen Immunsystems; ILC- angeborene lymphatische Zellen. [13]

Am Ursprung aller Blutzellen steht die schon erwähnte hämatopoetische Stammzelle (HSC), aus der sich wiederum ein gemeinsamer lymphoider und myeloider Vorläufer entwickelt (LMP). Ab dieser Zelle gibt es zwei unterschiedliche Richtungen, in die sich die LMP weiterentwickeln kann. Auf der einen Seite steht der myeloide Weg. Dieser hat einen gemeinsamen myeloiden Vorläufer als Grundlage, bevor auch dieser sich über unterschiedliche Zwischenstufen in die finalen Zellen dieser Abstammungsreihe entwickelt. Zellen dieser myeloiden Reihe sind zum Beispiel die roten Blutkörperchen, die Erythrozyten. Diese Zellen sind die Träger des roten Blutfarbstoffes Hämoglobin und somit für den Sauerstofftransport im Organismus verantwortlich [14]. Sie sind der am meisten vorkommende zelluläre Blutbestandteil und haben eine Lebensdauer in der Peripherie von 100 bis 120 Tagen [15]. Der zweithäufigste zelluläre Bestandteil des Blutes sind die Thrombozyten, die sich von ihrer im Knochenmark beheimateten Vorläuferzelle, dem Megakaryozyten, abspalten und anschließend für ca. 7 bis 10 Tage in der Peripherie zirkulieren [16]. Ihre wichtigsten Funktionen sind die Blutungsstillung bzw. Blutgerinnung nach Gefäßverletzungen [17]. Die Leukozyten machen den dritthäufigsten zellulären Blutbestandteil aus und umfassen alle in den folgenden Abschnitten kurz beschriebenen Zellen. In die Gruppe der Leukozyten zählen demnach auch die Mastzellen. Sie gelangen zunächst als unreife Vorstufen aus dem Knochenmark in die Peripherie und zirkulieren anschließend über den Blutstrom zu den Organen, wo sie schließlich vollständig zu Effektoren allergischer Reaktionen ausreifen [18]. So kann z.B. eine Mastzellinfiltration in der Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes in jeglicher Form der Nahrungsmittelallergie beobachtet werden [19]. Die Monozyten stellen eine weitere Zellpopulation der myeloiden Reihe dar, die in den peripheren Blutstrom entlassen werden und sich in Geweben final in Makrophagen bzw. dendritische Zellen differenzieren [20]. Diese ausdifferenzierten Zellen spielen in den Zielgeweben eine große Rolle hinsichtlich der Aufrechterhaltung der Homöostase sowie bei der Regulation von Abwehrreaktionen [21]. Die Granulozyten stellen die letzte Population der myeloiden Abstammungsreihe dar. Sie umfassen die Subpopulationen basophiler, eosinophiler und neutrophiler Granulozyten. Die Basophilen machen mit weniger als 1 % die kleinste Population unter den Leukozyten aus [22]. Sie zirkulieren nach der kompletten Ausreifung im Knochenmark lediglich für 2 bis 3 Tage in der Peripherie, bevor sie schließlich zugrunde gehen [23]. Ihre Funktionen sind mit denen der Mastzellen vergleichbar und liegen unter anderem in der Vermittlung einer protektiven Immunität gegenüber Pathogenen als auch in der Vermittlung allergischer Reaktionen [22]. Die zweite Gruppe der Granulozyten stellen die Eosinophilen dar. Diese machen mit 1 bis 3 % die zweitgrößte Granulozytenpopulation aus und fungieren als zytotoxische Effektoren bei der Bekämpfung von Pathogenen, aber auch im Prozess allergischer bzw. autoimmunologischer Reaktionen [24]. Die neutrophilen Granulozyten machen mit 50 bis 70 % den größten Anteil der Leukozyten aus. Diese Zellen stellen die erste Abwehrlinie des menschlichen Organismus

bei der Bekämpfung einer Vielzahl von Pathogenen dar [25]. Die Populationen der lymphoiden Abstammungsreihe umfassen neben den T-Lymphozyten, deren Biologie in Abschnitt 1.1.5 detailliert beleuchtet wird, auch die B-Lymphozyten. Diese sind durch ihre Fähigkeit der spezifischen Antikörperproduktion grundlegende Akteure der humoralen Immunantwort, zusätzlich zu ihrer essentiellen Rolle bei der Initiierung einer T-Zell-vermittelten Immunreaktion [26]. Auch die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) gehören in die Klasse der lymphoiden Zellen und haben einen enormen Einfluss auf die Bekämpfung viraler Pathogene als auch von Krebszellen [27]. Die lymphoiden Zellen (ILC) werden je nach Oberflächenexpression bestimmter Marker und ihres Zytokinexpressionsprofils in drei Gruppen unterteilt. Allen drei Gruppen ist aber ihre Funktion der Regulation der Gewebshomöostase und die frühe entzündliche Wirtsreaktion als Immunantwort gleich [28].

All diese beschriebenen Entwicklungsprozesse werden sowohl von Wachstumsfaktoren der Umgebung, als auch von der Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren gesteuert [29]. Aber auch die Zellen der Knochenmarksnische, die die Zellen der Hämatopoese umgeben, haben einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf den korrekten Ablauf der Prozesse, genau wie mikroRNAs [30, 31].

1.1.2 Angeborenes und erworbenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist der Teil des Immunsystems, der in erster Linie bei der Abwehr von Pathogenen reagiert und versucht, diese zu beseitigen. Hierzu zählen neben den angeborenen lymphoiden Zellen auch die bereits erwähnten Granulozyten, die monozytären Zellen, die NK-Zellen und die Mastzellen. Bei der unspezifischen Abwehr werden auf mikrobiologischen Pathogenen sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) von den *pattern recognition receptors* (PRRs) der Zellen der unspezifischen Abwehr erkannt und gebunden. Das wiederum bewirkt eine Aktivierung der Immunzellen, was zur Eliminierung von pathogenen oder auch infizierten körpereigenen Zellen führt [32]. Durch die Rekrutierung von Immunzellen des angeborenen Immunsystems und die damit verbundene Ausschüttung einer Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen wird eine akute Entzündungsreaktion im betroffenen Gebiet ausgelöst [33].

Kann auf diesem Weg keine Beseitigung des Auslösers erreicht werden, kommen die Zellen der spezifischen, erworbenen Immunantwort hinzu. Dazu zählen die B- und T-Lymphozyten, die wiederum nach Antigenkontakt über spezifische Rezeptoren aktiviert werden und versuchen, die pathogenen Zellen bzw. infizierten Körperzellen zu beseitigen. Zusätzlich können auf diesem Weg langlebige B- und T-Gedächtniszellen generiert werden, die bei einem erneutem Kontakt mit dem spezifischen Antigen eine schnelle und robuste Immunantwort gewährleisten [34].

1.1.3 Cluster of differentiation – CD-Marker

Für die Charakterisierung der unter 1.1.1 genannten Zelltypen wird das sogenannte *cluster of differentiation*-System zu Hilfe genommen. Dieses wurde 1982 mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, ursprünglich für die Identifizierung der Leukozyten, etabliert [35]. Mittlerweile gibt es aber eine ganze Reihe von CD-Markern, mit denen auch nicht-leukozytäre Blutzellen, entartete Zellen oder sogar bestimmte Krankheitsbilder identifiziert werden können [36–38]. Für diese Form der Identifizierung macht man sich die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle zu Nutze und kann diese wiederum mit Antikörpern markieren. Sind diese Antikörper z.B. mit unterschiedlichen Fluorophoren gekoppelt, können in einer Probe, sei es Gewebe oder eine Körperflüssigkeit wie Blut, viele verschiedene Zelltypen mit den geeigneten Methoden identifiziert und sogar quantifiziert werden. In dem ständig wachsenden Pool der CD-Marker konnten bis heute über 400 CD-Moleküle identifiziert werden [39], von denen 14 in der hier vorliegenden Arbeit untersucht und für die Identifizierung bestimmter Zellgruppen genutzt wurden.

1.1.4 Das MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-System – ein kurzer Überblick

Bei den sogenannten MHC-Klasse-I- bzw. MHC-Klasse-II- Molekülen handelt es sich um sogenannte *major histocompatibility complex*- Moleküle, die Schlüsselrollen bei der Vermittlung der Immunität gegenüber eindringenden Pathogenen innehaben.

Klassische MHC-Klasse-I- Moleküle werden dabei auf nahezu allen Körperzellen exprimiert und präsentieren endogen, von Tumorzellen oder virusinfizierten Zellen, generierte Peptide den CD8⁺ T-Zellen. Dabei bestimmt eine sehr große Vielfalt an unterschiedlichen Allelausprägungen der HLA-A-, HLA-B- und HLA-C-Gene, welche MHC-Klasse-I-Ausprägungsmerkmale ein Individuum besitzt [40, 41].

Nichtklassische HLA-Klasse-II-Moleküle kommen auf antigenpräsentierenden Zellen, wie z.B. dendritischen Zellen, vor und bieten Peptide exogenen Ursprungs den CD4⁺ T-Zellen an. Hier bestimmen die HLA-DPA/-DPB-, HLA-DQA/-DQB- und HLA-DRA/-DRB-Gene das phänotypische Ausprägungsmuster [40].

Speziell für den Fall therapeutischer Transplantationen, seien es Organe oder einzelne Zellen, ist die Identifikation der MHC-Moleküle sowohl des Spenders als auch des Empfängers essentiell [42]. Für den Fall einer bevorstehenden allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (alloHCT) wird nach einem Spender gesucht, der möglichst in 8/8 Antigenen, bezogen auf HLA-A, B, C und DRB1, übereinstimmt. Alle Ausprägungen, die weniger als 8 Übereinstimmungen aufweisen, werden als ‚*mismatch*‘ bezeichnet [43]. Transplantationen mit dem *mismatch* in nur einem Locus (7/8) sind bereits mit einer geringeren

Überlebensrate, einer höheren therapieassoziierten Mortalität und mehr akuten *Graft-versus-Host*-Krankheiten (GvHD) verbunden [44]. Eine GvHD ist eine immunologische Komplikation der alloHCT, bei der transplantierte zytotoxische CD8⁺ T-Zellen das Empfängergerewebe als fremd erkennen und beginnen zu proliferieren [45]. Diese Proliferation, einhergehend mit einer Aktivierung, kann je nach Ausprägungsgrad der Erkrankung zu Hautirritationen im leichten Fall bis hin zu schweren Organschäden oder sogar zum Tod des Empfängers führen [46]. Allerdings muss auch erwähnt werden, dass eine GvHD auch bei einer HLA-*matched* alloHCT in knapp 50 % der Transplantationen auftritt, was Hinweise auf die Existenz weiterer einflussnehmender MHC-Moleküle gibt [47, 48].

1.1.5 CD8⁺ T-Zellen als ein Teil des erworbenen Immunsystems

Die Funktion der T-Zellen, speziell der CD8⁺ T-Zellen, als Haupteffektoren der zellulären, erworbenen Immunantwort soll im folgenden Abschnitt näher beleuchtet werden.

T-Zellen sind wie bereits erwähnt eine Untergruppe der Lymphozyten, die im Knochenmark produziert werden, aber schließlich extramedullär im Thymus final heranreifen. Dort erlangen sie schließlich ihre charakteristische Oberflächenmarkerausprägung, die es erlaubt, die T-Zellen in zwei große Subklassen zu unterteilen: die CD3⁺/CD4⁺ und die CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen, deren verbindende Gemeinsamkeit die Expression des T-Zellrezeptor-CD3-Komplexes (TCR-Komplex) ist [49]. Der Thymus dient dabei für die noch unreifen T-Zellen als Ort der positiven und negativen Selektion. Dabei geschieht zunächst die positive Selektion, bei der von Thymozyten MHC-I- bzw. MHC-II-Moleküle präsentiert werden. Bei T-Zellen, die an MHC-I-Moleküle gebunden haben, wird die Expression von CD8 initiiert und bei der Bindung an MHC-II-Moleküle die Expression von CD4 [50]. Die anschließende Negativselektion dient der Eliminierung von T-Zellen, die körpereigene Peptide binden und somit eine Gefahr für das Auftreten autoimmunologischer Prozesse darstellen [51]. Diese Prozesse der Selektion finden hauptsächlich während der fetalen Entwicklung bzw. der frühen Lebensspanne statt. Mit Beginn der Pubertät schwindet sowohl die Thymusmasse als auch die damit verbundenen Prozesse der T-Zellreifung [52]. Die aus dem Thymus entlassenen reifen und naiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zirkulieren mit einer CD4⁺/CD8⁺ Ratio von ≥ 1 anschließend im Blutkreislauf und ruhen, bis sie aktiviert werden [53].

Bei den CD4⁺ T-Zellen, auch T-Helferzellen genannt, geschieht dies durch die Interaktion mit Antigen-MHC-Klasse-II-Komplexen. Diese Interaktion bewirkt eine Differenzierung der naiven Zellen in verschiedene Effektorsubtypen. Welcher Subtyp dabei entsteht, ist vom umgebenden Zytokinmilieu abhängig [54]. Auf diese Weise können 7 CD4⁺ T-Zellsubsets identifiziert werden, deren spezifische Zytokinexpressionsmuster ihre jeweilige spezielle Funktion bestimmen [55].

Die zweite große Subklasse der T-Zellen sind die CD8⁺ T-Zellen, auch zytotoxische T-Zellen genannt. Das Aktivierungsschema dieser und die daraus resultierenden möglichen Subtypen sind in Abbildung 2 dargestellt.

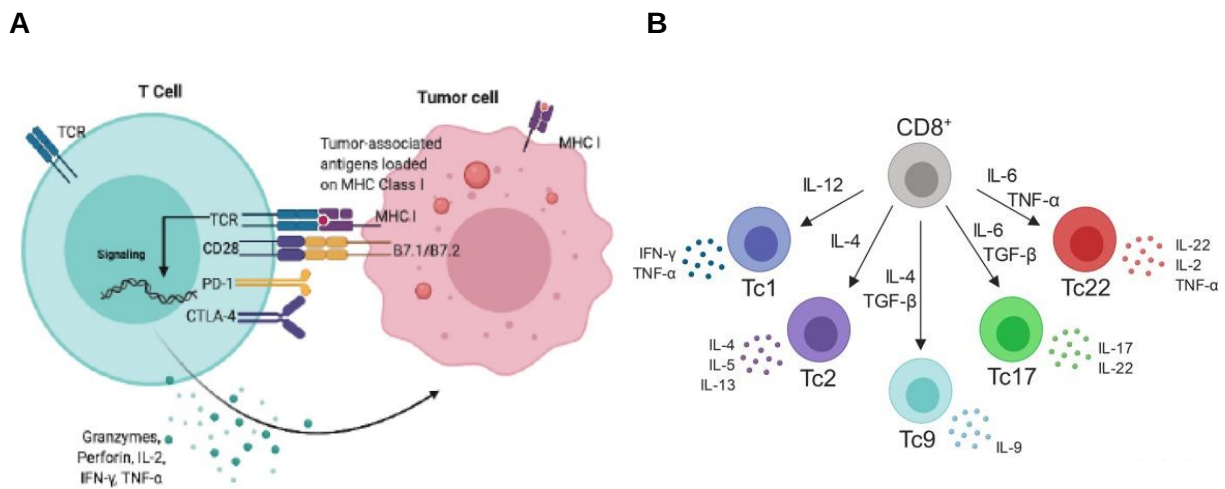


Abb. 2: Schematische Darstellung der Aktivierung einer CD8⁺ T-Zelle (A) und die fünf möglichen daraus resultierenden Subtypen (B). Es sind die aktivierenden (TCR, CD28) und inhibierenden Rezeptoren (PD-1, CTLA-4) der T-Zelle sowie die Liganden auf der Tumorzelle (MHC-I, B7.1/B7.2) dargestellt (A) [56]. Die nach CD8⁺ T-Zellaktivierung möglichen Subtypen und die von ihnen produzierten Zytokine sind ebenfalls skizziert (B) [57].

Die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen ist dabei in drei Schritte eingeteilt (Abb. 2A). Im ersten Schritt erkennt der TCR-Komplex den Antigen-MHC-Klasse-I-Komplex und interagiert mit diesem. Schritt zwei beinhaltet die Kostimulation durch eine Reihe von unterschiedlichen Rezeptoren, in diesem Beispiel die Interaktion von CD28 der T-Zelle mit B7.1 oder B7.2 der Tumorzelle [56]. B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) sind dabei kostimulatorische Moleküle, die sowohl auf antigenpräsentierenden Zellen, als auch Tumorzellen exprimiert werden. Gleichzeitig stellen sie aber auch die Liganden für den CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*)-Rezeptor dar, einen koinhibitorischen T-Zellrezeptor. Die Expression dieses Rezeptors ist nach T-Zellaktivierung hochreguliert und kann dann wiederum mit einer wesentlich höheren Affinität B7.1 und B7.2 binden, was für die T-Zellaktivität ein inhibierendes Signal darstellt. Ähnlich verhält es sich mit dem PD-1 Rezeptor (CD279) der T-Zellen. Bei Bindung der Liganden PD-L1 und PD-L2 (nicht dargestellt) führt auch die Aktivierung dieses Rezeptors zu einer Inhibierung der T-Zellproliferation und der zytotoxischen Wirkung dieser T-Zellen [58, 59]. PD-L1 und PD-L2 werden sowohl in normalen Geweben, als auch in Tumoren exprimiert. Wobei Tumore eine weitaus höhere Expression aufweisen und auf diesem Wege eine sie abtötende Immunantwort abwenden [60]. Diese beiden Rezeptoren werden als *immune checkpoints* bezeichnet und sind erfolgreiches Ziel der *Checkpoint-Inhibitor*-Immuntherapie verschiedener Krebserkrankungen. Dabei werden die inhibierenden Rezeptoren blockiert, sodass die T-Zellaktivierung nicht inhibiert wird und die T-Zellen das

Tumorstadium kontinuierlich eindämmen können [61, 62]. Das letzte für die Aktivierung benötigte Signal stellt die Stimulation mit Zytokinen, wie z.B. IL-12 und IL-18, dar (nicht abgebildet) [63]. Ebenso hat IL-2, was auch von bereits aktivierten T-Zellen produziert wird, eine stimulierende Wirkung [64]. Diese Signalkaskade führt wiederum zur Aktivierung verschiedener *Downstream*-Signalwege, die unter anderem für die vermehrte Ansiedlung von Glukosetransportern auf der Zelloberfläche der T-Zelle sorgen. Die Prozesse der anschließenden gesteigerten Proliferation und Zytokinproduktion und -freisetzung sind sehr energieaufwändig, weshalb aktivierte CD8⁺ T-Zellen einen höheren Glukosebedarf haben. Auf diesem Weg produzierte und freigesetzte Effektorzytokine sind unter anderem IL-2, IFN γ und TNF α , aber auch Perforine und Granzyme [65–67]. Perforine bilden in den Tumorzellen Poren, was die Zelle schließlich tötet. Granzyme sind pro-apoptische Serinproteasen, die bei Eindringen in die Tumorzelle ebenfalls zu deren Lyse führen [67, 68]. Das Expressionsmuster der verschiedenen Zytokine und der daraus resultierenden CD8⁺ T-Zellsubgruppen ist in Abbildung 2B zu sehen. Zytotoxische T-Zellen 1 (Tc1) und 2 (Tc2) sind Effektorzellsubpopulationen die durch Stimulation mit IL-12 bzw. IL-4 generiert werden. Beide Gruppen vollziehen *in vitro* hauptsächlich eine perforinabhängige Zytolyse der Zielzellen, sezernieren aber unterschiedliche Zytokine [69]. Die IL-9 produzierenden Tc9-Zellen weisen hingegen *in vitro* im Gegensatz zu Tc1-Zellen eine signifikant schwächere zytolytische Aktivität auf [70], was auch für die Tc17-Zellen zutrifft [71]. Die zytolytische Aktivität der Tc22-Zellen kann wiederum *in vivo* durch die Gabe von Pantothenat, einem Nahrungsergänzungsmittel, gesteigert werden [72]. Der Aktivierungsstatus von CD8⁺ T-Zellen kann nicht nur anhand ihrer Proliferation oder der Expressionssteigerung bestimmter Zytokine nachgewiesen werden, sondern auch mittels der Analyse veränderter Oberflächenexpressionen verschiedener CD-Marker. CD25 und CD122 sind zum Beispiel solche Marker. Dabei handelt es sich um zwei der drei Untereinheiten des IL-2 Rezeptors, der aus einer α - (CD25), einer β - (CD122) und einer γ - (γ_c) Kette besteht. Eine Stimulation der CD8⁺ T-Zellen bewirkt eine Hochregulation der Expression der beiden genannten CD-Moleküle und damit eine Erhöhung der Sensitivität gegenüber IL-2 [73]. IL-2 wiederum wirkt steigend auf die von CD8⁺ T-Zellen vermittelte Immunantwort, hat aber auch inhibierende Wirkung auf z.B. die Differenzierung einer Subgruppe der CD4⁺ T-Helferzellen. Dieses Interleukin nimmt damit eine kritische Rolle bei der Ausbalancierung immunstimulierender und immunsupprimierender Prozesse ein [74]. Auch CD71 ist ein bekannter T-Zellaktivierungsmarker, der wie CD25 ca. 72 h nach Aktivierung sein Expressionsmaximum erreicht. Ganz im Gegensatz zu CD69, einem sehr frühen Marker der CD8⁺ T-Zellaktivierung. Dieser erreicht bereits 24 h nach Aktivierung sein maximales Expressionslevel, welches danach wieder signifikant abnimmt [75].

1.1.6 Myelodysplastische Neoplasien

Myelodysplastische Neoplasien (MDS) sind eine heterogene Gruppe hämatologischer Stammzellerkrankungen (HSC), die mit einer ineffektiven Hämatopoese und folglich nicht-funktionellen Blutzellen assoziiert sind. Die pathophysiologischen Ursachen sind vielfältig und umfassen zum Beispiel in ca. 50 bis 60 % der Fälle chromosomale Aberrationen, wie z.B. die Deletion des langen Arms von Chromosom 5 (5q-del) oder auch Trisomie 8. Weiterhin können in 80 bis 90 % der Fälle somatische Mutationen in mehr als 50 Genen identifiziert werden, die zum Beispiel an *Splicing*- aber auch Differenzierungsprozessen, sowie an epigenetischen Regulationen beteiligt sind [1, 2]. Aber auch dem Mikromilieu der hämatopoetischen Stammzelle lastet ein gewisser Anteil an Krankheitsentwicklung und -progress an. Dafür spricht die Tatsache, dass trotz des Vorhandenseins ‚gesunder‘ HSC-Klone, diese ihrer Funktion nicht nachgehen. Die genauen pathophysiologischen Mechanismen der Krankheitsentstehung sind allerdings noch nicht im Detail aufgedeckt [2, 76].

MDS treten mit einer Alters-standardisierten Inzidenzrate von 2,5-3,4/100.000 Einwohnern auf. Für diese Zahlen aus dem Jahr 2022 wurden die Daten aus den Niederlanden, Deutschland, der Schweiz und den USA ausgewertet. Zahlen aus Australien (3,2/100.000) und Neuseeland (3,7/100,00) decken sich damit [77]. Allerdings wird auch ersichtlich, dass die Inzidenz bei den über 70-jährigen schon bei 30/100.000 liegt [78]. Außerdem sind Männer geringfügig häufiger betroffen als Frauen [79].

Wie bereits erwähnt, zeichnet sich die Gruppe der MDS durch eine ineffektive Hämatopoese aus, die wiederum in nicht-funktionellen Blutzellen, sogenannten Blasten, resultiert. Diese Blasten weisen neben ihrer Unfähigkeit der Differenzierung auch die Neigung zu einer exzessiven frühzeitigen Apoptose auf, die wiederum zu peripheren Zytopenien führt [80]. Da jede der unter 1.1.1 genannten aus der HSC hervorgehende Zellreihe betroffen sein kann, sind die möglichen Symptome sehr divers und reichen von anämischen Erscheinungsbildern, wenn die erythroide Linie betroffen ist, über erhöhte Blutungsneigungen, wenn die Thrombozytenreihe nur ineffektiv gebildet wird bis hin zu immer wiederkehrenden Infekten bei einer Beeinträchtigung der Zellbildung der Granulozytenreihe [81]. Auch eine Beeinträchtigung mehrerer Linien und eine damit einhergehende Multisymptomatik ist möglich. Die Diagnostik, an welcher Form von MDS der Patient erkrankt ist, stützt sich dabei auf die Untersuchung von Blut und Knochenmark. Diese basiert neben den (zyto)genetischen Analysen auf morphologischen Untersuchungen und der Analyse spezifischer CD-Marker. Die aktuellste Klassifikation der MDS stammt aus dem Jahr 2022 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und ist in Tabelle 1 dargestellt [82].

Tab. 1: Klassifikation von myelodysplastischen Neoplasien laut WHO (Stand 2022). Ausschlaggebend für die Einteilung in die einzelnen Gruppen ist neben dem prozentualen Anteil von Blasten in Knochenmark (BM) und peripheren Blut (PB) auch die Zytogenetik und eventuell vorhandene Mutationen [82].

	Blasts	Cytogenetics	Mutations
MDS with defining genetic abnormalities			
MDS with low blasts and isolated 5q deletion (MDS-5q)	<5% BM and <2% PB	5q deletion alone, or with 1 other abnormality other than monosomy 7 or 7q deletion	
MDS with low blasts and <i>SF3B1</i> mutation ^a (MDS- <i>SF3B1</i>)		Absence of 5q deletion, monosomy 7, or complex karyotype	<i>SF3B1</i>
MDS with biallelic <i>TP53</i> inactivation (MDS-bi <i>TP53</i>)	<20% BM and PB	Usually complex	Two or more <i>TP53</i> mutations, or 1 mutation with evidence of <i>TP53</i> copy number loss or cnLOH
MDS, morphologically defined			
MDS with low blasts (MDS-LB)	<5% BM and <2% PB		
MDS, hypoplastic ^b (MDS-h)			
MDS with increased blasts (MDS-IB)			
MDS-IB1	5–9% BM or 2–4% PB		
MDS-IB2	10–19% BM or 5–19% PB or Auer rods		
MDS with fibrosis (MDS-f)	5–19% BM; 2–19% PB		

^aDetection of $\geq 15\%$ ring sideroblasts may substitute for *SF3B1* mutation. Acceptable related terminology: MDS with low blasts and ring sideroblasts.

^bBy definition, $\leq 25\%$ bone marrow cellularity, age adjusted.

BM bone marrow, PB peripheral blood, cnLOH copy neutral loss of heterozygosity.

In der Tabelle sind die zwei großen MDS-Typen ‚MDS mit genetischen Abnormalitäten‘ und ‚morphologisch definierte MDS‘ mit ihren Untergruppen ersichtlich. Die Eingruppierung in diese erfolgt dann wiederum auf Basis der Evaluation des Blastenanteils in Knochenmark und peripheren Blut sowie der Zytogenetik und eventuell vorhandenen Mutationen. *SF3B1*-Mutationen treten am häufigsten auf und werden deshalb als eigenständige Gruppe aufgeführt. Dieses Gen codiert eine Untereinheit des *splicing factor 3b protein complex* [83]. Patient*innen mit Mutationen im bekannten Tumorsuppressorgen TP-53 bilden ebenfalls eine eigenständige Gruppe, da Patient*innen mit TP-53-Mutationen in unabhängigen Studien die schlechtesten Ergebnisse zeigten [84].

Patient*innen mit MDS entwickeln in 50 % der Fälle eine AML, eine akute myeloische Leukämie (AML), auch sekundäre AML genannt [85]. Hierbei steigen die Blasten, die meist zu 85 % den myeloiden und zu 15 % den lymphoiden Phänotyp aufweisen, in Knochenmark oder/und Peripherie auf $\geq 20\%$ an. Zhu et al. und Guo et al. beschrieben in den Jahren 2018 und 2020 allerdings zwei Fallbeispiele, bei denen die MDS-Patient*innen eine akute lymphatische B-Zellleukämie (B-ALL) entwickelt haben, eine Erkrankung der lymphoiden

Abstammungsreihe. Hierbei zeichnen sich die Blasten nur durch den lymphoiden Phänotyp aus, was aber nur sehr selten anzutreffen ist [85, 86]. Neben der bereits genannten Einteilung in die einzelnen MDS-Subtypen werden die unbehandelten MDS-Patient*innen auch noch hinsichtlich ihrer Prognose in Risikogruppen eingeteilt. Dies geschieht mit Hilfe des sogenannten *Revised International Scoring System* (IPSS-R). Dafür werden Punkte bei der Analyse der peripheren Zytopenien und dem Blastengehalt im Knochenmark sowie bei der Identifikation zytogenetischer Charakteristika vergeben. Addiert man diese Punkte, kann man in der *IPSS_R Score Value* Tabelle die Risikoeinteilung ablesen. Hat der Patient 0 Punkte, so ist er in der Risikogruppe ‚very low‘. Mit zunehmendem Wert steigt auch die Einteilung zunächst in die Risikogruppe ‚low‘, gefolgt von ‚intermediate‘ und ‚high‘ bis hin zu einem Punktwert von >6, der eine Einteilung in die Risikogruppe ‚very high‘ zur Folge hat [87]. Seit 2023 werden auch Genomdaten mit in die Risikoberechnung einbezogen, weshalb die aktuellste Klassifikation das IPSS_M (*Molecular International Prognostic Scoring System*) darstellt [88]. Diese wird aber nicht näher erläutert, da die in der vorliegenden Arbeit genutzten Proben nach dem IPSS_R klassifiziert wurden. Auch die Wahl der Therapie basiert auf der Evaluation verschiedenster Einflussfaktoren wie Risikoeinteilung, Transfusionsbedarf, zytogenetisches Profil oder auch das Potential des Patient*innen für eine allogene Stammzelltransplantation. Dabei wird in erster Linie darauf geachtet, was das Ziel der Therapie sein soll. So wird zum Beispiel bei Patient*innen in der niedrigen Risikogruppe eine potentielle Heilung, bei Patient*innen in der sehr hohen Risikogruppe dagegen eine Erhöhung der Überlebensrate angestrebt. Zu den Therapiestrategien zählen unter anderem die Gabe von Wachstumsfaktoren, Hypomethylierungsagenzien (HMA) und Lenalidomid [88]. Bei letzterem handelt es sich um einen Immunmodulator, der die Proliferation und Zytokinproduktion hämatopoetischer Tumorzellen hemmt. Des Weiteren werden Chemotherapien, Immunsuppressiva oder auch alloHCTs als Therapie eingesetzt. Welche Therapiestrategie letztendlich eingeschlagen wird, ist stark von der Reaktion des Patient*innen auf eine bereits angesetzte Therapie bzw. dem Vorhandensein von Komorbiditäten abhängig [89, 90]. Festzuhalten ist, dass die alloHCT bis jetzt die einzig kurative Therapie für MDS ist. Dabei stellt die Wahl der Kandidaten bzw. der Zeitpunkt der Transplantation ein entscheidendes Verfahren dar, um am Ende den maximalen Benefit zu erhalten [91]. Auch wenn ein Einsatz in einer frühen Krankheitsphase die größten Erfolge aufweist, ist bei Patient*innen der niedrigen Risikogruppe zum Beispiel aufgrund der geringen Krankheitsausprägung abzuwägen, ob die mit einer hohen Mortalitätsrate von 26 bis 41 % behaftete MDS-alloHCT nicht vielleicht doch einer Standardtherapie vorgezogen werden sollte [92]. Patient*innen der Hochrisikogruppe sollten auf jeden Fall für eine alloHCT berücksichtigt werden, sofern sie max. 70 bis 75 Jahre alt sind und sich in einer guten klinischen Verfassung

ohne schwere Komorbiditäten befinden [90]. Die stringente Selektion der Patient*innen ist unter Anbetracht der möglichen Nebenwirkungen der alloHCT, unter anderem GvHD und schwerwiegende Infektionen, essentiell. Dabei stellen die beiden genannten Komplikationen die Hauptgründe für die hohe Mortalitätsrate der alloHCT dar [93].

1.2. MikroRNAs

1.2.1 Prozessierung und Nomenklatur der mikroRNAs

MikroRNAs (miRNAs) sind ungefähr 22 Nukleotide (nt) lange, nicht kodierende einzelsträngige RNA-Moleküle. Sie entstehen über verschiedene hintereinandergeschaltete Prozesse, die in Abbildung 3 dargestellt sind.

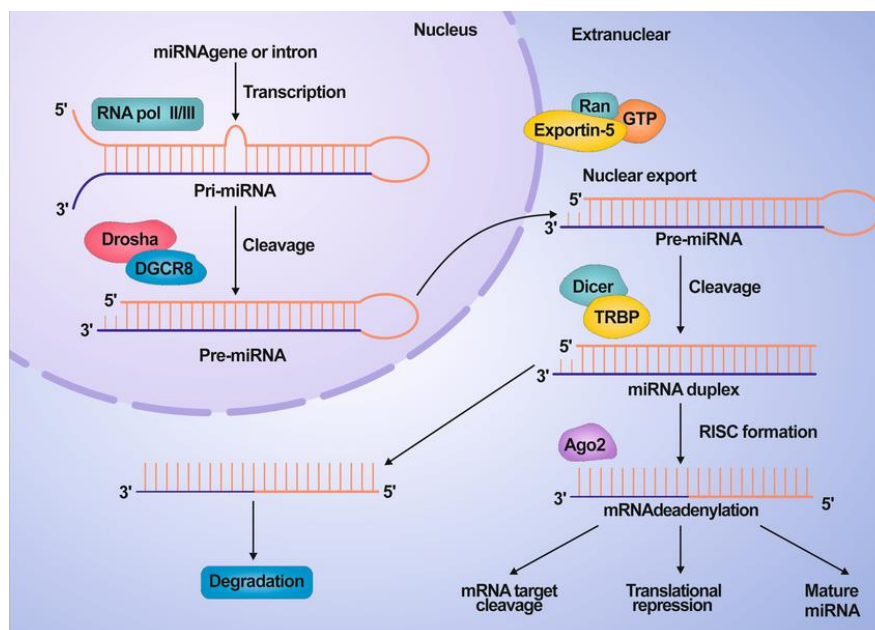


Abb. 3: Schematische Darstellung der mikroRNA-Prozessierungsschritte. Die mikroRNA-Prozessierung geschieht über die pri- und pre-mikroRNA im Zellkern (Nucleus) und verläuft im Zytoplasma (Extranuclear) weiter über eine miRNA-Duplex, deren funktioneller Strang mit der mRNA interagiert, während der nicht-funktionelle Strang degradiert wird [95].

Zunächst wird mittels der RNA-Polymerase II oder III eine pri-mikroRNA prozessiert, die anschließend vom Drosha-DGCR8 Komplex (*Microprocessor complex*) in eine pre-mikroRNA zerschnitten wird. Diese, wie eine Haarnadel (*hairpin*) strukturierte pre-miRNA, wird wiederum mit Hilfe von Exportin-5-Ran-GTP vom Zellkern ins Zytoplasma exportiert. Hier wird ihr dann durch den Komplex von *Dicer*, einem RNase III-Protein, und TRBP (*trans-activation response RNA binding protein*) die Loopregion abgeschnitten, sodass eine miRNA-Duplex entsteht. Die dadurch entstandene doppelsträngige miRNA kann anschließend auf das Argonautenprotein 2 (AGO2) geladen werden, was die Formation des sogenannten RISC-Komplexes (*RNA-induced silencing complex*) bewirkt. Dieser führt dazu, dass die Duplex entwunden wird und sich 2 miRNA-Einzelstränge bilden. Der am AGO2-Komplex verbleibende Strang ist dabei die mature miRNA, während der zweite Strang degradiert wird [94, 95]. Die mature mikroRNA kann dann wiederum über zwei unterschiedliche Wege eine Proteinsynthese bereits auf mRNA-Ebene inhibieren.

Bindet die mikroRNA dabei komplementär an die Ziel-mRNA, dann wird diese zerstört. Findet eine nicht komplementäre Bindung statt, dann wird lediglich die Translation der mRNA gehemmt. Des Weiteren kann eine mikroRNA an mehrere mRNAs gebunden werden und andersrum kann eine mRNA von mehreren mikroRNA gebunden werden. Die einzelnen Bindungen sind wiederum abhängig, wie viel von der mikroRNA bzw. der mRNA exprimiert wird [96].

Die erste mikroRNA wurde im Jahr 1993 entdeckt [97] und seitdem ist der Pool dieser kurzen RNA-Moleküle stetig gewachsen. *miRBase database (v22)* ist eine mikroRNA-Datenbank mit Informationen über mikroRNAs von insgesamt 271 Organismen. Laut dieser Datenbank enthält das menschliche Genom 2654 mature mikroRNA-Sequenzen (Stand 2019). Die Quelle der Datenbank stellen verschiedenste Forschungseinrichtungen dar, die einen Großteil der eingegebenen mikroRNAs über *small RNA deep sequencing* identifiziert haben. Aufgrund der enormen Anzahl an Eingaben ist eine stringente Kontrolle der einzelnen Identifikationen nicht gegeben, weshalb bei den mikroRNAs, die auf *mirBase* gelistet sind, keine Garantie für deren tatsächliche Existenz gewährleistet werden kann. Natürlich nur, sofern sie nicht bereits experimentell belegt werden konnte [98].

Bei der Benennung der mikroRNAs können auch beide entstandenen Einzelarme berücksichtigt werden, da jeder von ihnen mit unterschiedlicher Präferenz gebunden werden kann und eine mature mikroRNA bildet. Nachdem die Spezies mit einem Kürzel definiert wird, *hsa* für human, folgt die Nummer der mikroRNA, in Reihenfolge ihrer Entdeckung bzw. Eintragung in *miRBase*. Dem folgt dann die Identifikation des miRNA-Armes, der beim Ursprung der miRNA vom 5'-Ende der pre-miRNA als *-5p* und beim Ursprung der miRNA vom 3'-Ende der pre-miRNA als *-3p* gekennzeichnet wird [99]. Für viele mikroRNAs sind noch keine Targets bekannt. Bei denen die bekannt sind muss unterschieden werden, ob sie experimentell nachgewiesen oder lediglich mittels *predictions tools* (wie z.B. *miRTargetLink2.0*, *TargetHumanScan 8.0* oder *miRWalk*) identifiziert wurden. Diese sagen mit Hilfe bioinformatischer Analysen mögliche mikroRNA-mRNA Interaktionen, aber ohne experimentelle Validierung, voraus.

1.2.2 Funktion der mikroRNAs – speziell in MDS

Durch die Degradierung bzw. die Translationshemmung von mRNA-Molekülen verhindern mikroRNAs die Produktion verschiedenster Proteine und sind somit Feinregulatoren nahezu aller biologischen Prozesse aller Eukaryonten. So konnten Ventura et al. über *knock-out* Experimente in Mäusen zum Beispiel nachweisen, dass das miR-17~29 Cluster essentiell für die murine B-Zellentwicklung ist und ein *knock-out* dieses Clusters zu einer verringerten B-Zellentwicklung und einer gesteigerten Apoptose führt [100]. Rasmussen et al. deckten auf,

dass ein miR-144/451 Cluster-*knock-out* zu einer ineffektiven Hämatopoese, genauer der Erythropoese, und somit zu Anämiesymptomen führt [101]. Zusätzlich weisen auch viele Krankheitsbilder veränderte mikroRNA-Expressionsmuster auf. Diese Tatsachen machen deutlich, dass mikroRNAs an der Entstehung und/oder dem Progress verschiedener Krankheiten beteiligt sind bzw. Targets für neue Therapiestrategien darstellen oder sogar als Biomarker für die Diagnostik dienen könnten. So konnten Heng et al. miR-106a als möglichen Treiber der Entzündung bei Sepsis identifizieren, wobei die genauen Signalwege Gegenstand weiterer Forschungen sind [102]. Ma et al. wiederum haben zum Beispiel therapeutisches Potential von miR-182 in der Brustkrebstherapie entdeckt. Brustkrebszellen induzieren miR-182-Expression, was dazu führt, dass Makrophagen alternativ aktiviert werden und somit die Tumorentwicklung vorantreiben. Eine Inhibition dieser mikroRNA in murinen Makrophagen hat eine deutliche Suppression des Tumorwachstums und der Lungenmetastasierung zur Folge [6]. Über die Klassifikation des Krebsstadiums bei nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom können zum Beispiel die Expressionsprofile von miR-21, miR-210 und miR-372 im Sputum der Patient*innen Aufschluss geben [103].

Wie bereits erläutert, wirken mikroRNAs auch bei der Krebsentwicklung mit, aber nicht nur bei soliden Tumoren, sondern auch bei hämatologischen Malignitäten. So konnten Pons et al. in den mononukleären Zellen des Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) unter anderem miR-15a, miR-10a, miR-18a und miR-222 als überexprimiert in MDS-Proben identifizieren, wobei dies für miR-18a zusätzlich in den mononukleären Zellen Knochenmarks (*bone marrow-mononuclear cells*, BM-MNC) zutraf [104]. MiR-143 wird laut Cui et al. in Knochenmarksproben von MDS-Patient*innen der Hochrisikogruppe weniger exprimiert als im Vergleich zur Niedrigrisikogruppe [105]. Auch die miR-27a-3p- und miR-150-5p-Expressionen sind laut Merkerova et al. im Blutplasma von Hochrisiko MDS-Patient*innen deutlich herunterreguliert [106]. Diese Unterschiede zwischen Hoch- und Niedrigrisikogruppe konnten auch Montes et al. und Sokol et al. feststellen. Sie konnten eine Überexpression von miR-18a, miR-34a und miR-21 in peripheren Blutproben von MDS-Patient*innen im Vergleich zu gesunden Probanden nachweisen. Parallel dazu fanden sie heraus, dass innerhalb der MDS-Patient*innen-Kohorte die Hochrisikogruppenpatient*innen die vergleichsweise höchsten Expressionswerte von miR-18a und miR-34a aufweisen [7]. Die Überexpression der mikroRNAs der miR-181 Familie in BM-MNC von MDS-Patient*innen konnte von Sokol et al. nachgewiesen werden [8]. Dies ist nur ein kleiner Ausschnitt der mikroRNAs, die bereits als in MDS differentiell exprimiert identifiziert worden sind. Die explizite Rolle der mikroRNAs bei der Entstehung bzw. dem Progress von MDS sind aber weitestgehend unbekannt und Gegenstand weiterer Forschungen. Für die vorliegende Arbeit wurden 5 dieser mikroRNAs detaillierter analysiert.

1.3. Zielstellung

Die Hypothesen meiner Dissertation lauten:

Hypothese 1: Die Funktion differentiell exprimierter mikroRNAs in MDS bezüglich Entstehung und Progression der Erkrankung kann im Modellsystem mit hämatopoetischen Vorläuferzelllinien verstanden werden.

Hypothese 2: Der vergleichende Einsatz einer etablierten MDS-Zelllinie parallel zu einer AML-Zelllinie wird explizit bei Zelldifferenzierungsanalysen die unterschiedliche Bedeutung der differentiell exprimierten mikroRNAs darstellen.

Hypothese 3: Die T-Zellen des Knochenmarks, als Bestandteil der hämatopoetischen Stammzellnische, von MDS-Patient*innen weisen ein differentielles mikroRNA-Profil im Vergleich zu nicht-MDS-Proband*innen auf.

Hypothese 4: Veränderte mikroRNA-Profile in den T-Zellen der Stammzellnische von MDS-Patient*innen haben einen Einfluss auf Entstehung und Progression der Krankheit.

Um die erste Hypothese zu beweisen, werden einige der bisher im Kontext mit MDS differentiell exprimierten mikroRNAs hinsichtlich ihrer Zielgene/-strukturen und Funktionen in MDS-L- und THP-1-Zellen untersucht. Hierbei werden Analysen des Zellzyklus, der Proliferation und das Differenzierungsverhalten unter der Stimulation unterschiedlicher Differenzierungsreagenzien der genannten Zelllinien nach Überexpression verschiedener mikroRNA-Kandidaten analysiert. Durch die Aufdeckung der Funktionen dieser mikroRNAs ist es möglich, sie in den Fokus der Therapie- oder Biomarkerstrategien der myelodysplastischen Neoplasien zu rücken bzw. sie bei der Erstellung dieser mit einzubeziehen. Durch den parallelen Einsatz der MDS-Zelllinie MDS-L und der leukämischen Zelllinie THP-1 sollen gleichzeitig die verschiedenen Wirkungsspektren einzelner mikroRNAs belegt werden, was die zweite Hypothese der vorliegenden Arbeit adressiert. Für die Bestätigung dieser beiden Hypothesen wurden mikroRNAs analysiert, die auf der Untersuchung von Gesamtknochenmark bzw. der CD34⁺- Subpopulation von Knochenmarkproben basieren. Um die dritte Hypothese dieser Arbeit zu belegen, wurde ein Zellmarkierungspanel für eine durchflusszytometrische Analyse erarbeitet, welches es erlaubt, die einzelnen Zellsubpopulationen in Knochenmarkproben von MDS-Patient*innen und nicht-MDS-Proband*innen zu identifizieren und gleichzeitig spezifisch die T- Zellsubpopulationen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu sortieren.

Eine anschließende *Array*-Analyse dieser beiden Subpopulationen soll schließlich einen bisher nicht vorhandenen Einblick in die mikroRNA-Expressionsprofile dieser Immunzellen der hämatopoetischen Stammzellnische gewährleisten. Die so gewonnenen Erkenntnisse auf der Ebene der T-Zellen sollen wiederum in funktionellen Assays tiefergehend ergründet werden. Dafür wurden CD8⁺ T-Zell-Kokulturen mit den MDS-L- und THP-1-Zelllinien etabliert, die unter dem Einsatz mikroRNA-transfizierter primärer T-Zellen einen Aufschluss über die Funktion der in den *Arrays* identifizierten, in MDS differentiell exprimierten mikroRNAs liefern sollen. Mit Hilfe dieser Erkenntnisse soll die letzte Hypothese dieser Arbeit belegt werden.

2. Material

2.1. Chemikalien und Reagenzien

Tab. 2: Verwendete Chemikalien/Reagenzien und deren Hersteller.

Bezeichnung	Hersteller
Albumin aus Rinderserum	Merck
All- <i>trans</i> -Retinsäure	Merck
Ammoniumthiocyanat	Carl Roth
Ampuwa® Wasser	Fresenius Kabi
<i>BD GolgiStop™ Protein Transport Inhibitor (Containing Monensin)</i>	Fisher Scientific
Biocoll® Trennlösung	Biochrom
Carboxyfluoresceinsuccinimidylester	Merck
<i>CD8 MicroBeads, human</i>	Miltenyi Biotec
Chloroform	Th. Geyer
Citronensäure	Carl Roth
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Solution (DPBS)</i>	Merck
Dimethylsulfoxid	Merck
Erythrozyten-Lysepuffer	c.c.pro GmbH
Ethanol, absolut	Honeywell, Riedel-de Haën
Ethylendiamin-tetraessigsäure, Tetranatriumsalz Hydrat	Carl Roth
<i>FBS Superior</i>	Merck
<i>FcR Blocking Reagent, human</i>	Miltenyi Biotec
Glycerol	SERVA Electrophoresis GmbH
Glykogen, RNA-Qualität	Thermo Fisher Scientific
Guanidinthiocyanat	SERVA Electrophoresis GmbH
<i>Human Recombinant IL-3</i>	STEMCELL TECHNOLOGIES
Interleukin-2 (Proleukin® S, 18x10 ⁶ IE)	Novartis Pharma
<i>iQ™ SYBR® Green Supermix</i>	Bio-Rad
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Carl Roth
Nukleotidlösungen, 100 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Thermo Fisher Scientific
<i>MISSION® microRNA Mimic</i>	Merck
<i>PBS-Powder substance without Ca²⁺, Mg²⁺</i>	Biochrom
Penicillin-Streptomycin	Merck

Phorbol-12-myristat-13-acetat	Merck
Phythämagglutinin	Merck
Propidiumiodid	Merck bzw. Miltenyi Biotec
<i>Random hexamer primer</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>RevertAid H Minus Reverse Transcriptase</i> (200 U/μL)	Thermo Fisher Scientific
<i>RiboLock RNase Inhibitor</i> (40 U/μl)	Thermo Fisher Scientific
Roti®-Phenol	Carl Roth
RPMI-1640 Medium	ATCC
Trypablau (0,5 %; v/v) in physiol. NaCl (0,9 %; v/v), <i>toxic</i>	BioConcept
<i>Tween® 20</i>	Carl Roth
<i>Viromer® GREEN</i>	Lipocalyx
<i>Vybrant®Dil</i> Zellkennzeichnungslösung	Thermo Fisher Scientific
<i>X-VIVO 15, serum-free, hematopoietic cell medium</i>	Lonza
1α,25-Dihydroxyvitamin D ₃ (VitD ₃)	Sigma-Aldrich
2-Propanol	Carl Roth
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich

2.2. Lösungen

Tab. 3: Verwendete Lösungen und ihre Zusammensetzung.

Bezeichnung	Zusammensetzung
FACS-Puffer	PBS mit 2 mM EDTA, 1 % (v/v) FBS und 0,05 % (v/v) NaN ₃
MACS-Puffer	DPBS mit 2 mM EDTA und 0,5 % (v/v) FBS
PBS	9,55 g PBS-Powder ad 1000 ml Wasser
Trizol	3,1 g NH ₄ SCN, 5 g Glycerol, 9,5 g C ₂ H ₆ N ₄ S, 3,5 ml C ₂ H ₃ NaO ₂ (3 M, pH 4), 48 ml Phenol ad 100 ml mit Ultra-pure Wasser

2.3. Geräte

Tab. 4: Verwendete Geräte.

	Gerät	Hersteller
Bioanalyzer	<i>2100 Bioanalyzer Instrument</i>	Agilent
Durchflusszytometer	<i>MACSQuant® Analyzer 10 bzw. 16</i>	Miltenyi Biotec
Magnetständer	<i>QuadroMACS® Separator</i>	Miltenyi Biotec
Mikroplattenleser	<i>Multimode microplate reader, BioTekSynergy</i>	Agilent

Real Time PCR System	<i>qTower³G</i>	Analytic Jena
Rotations-Vakuum-Konzentrator	<i>Speedvac</i>	Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH
Thermozykler	<i>Labcycler 48</i>	Sensoquest
Zellsorter	<i>FACSaria II Cell Sorter</i>	BD Biosciences
Zentrifugen	<i>Heraeus Multifuge X1R Centrifuge</i> bzw. <i>Heraeus Fresco 17 Centrifuge</i>	Heraeus

2.4. Kits

Tab. 5: Verwendete Kits.

Bezeichnung	Hersteller
<i>Click-iTTM-EdU</i> - Zellproliferationskit für Bildgebung, <i>Alexa FluorTM</i> 647 Farbstoff	Thermo Fisher Scientific
<i>NucleoSpin[®] miRNA</i> , <i>Mini kit for miRNA and RNA purification</i>	Macherey-Nagel

2.5. Primer

Tab. 6: Verwendete mikroRNA-Primer mit der entsprechenden Sequenz und der zugehörigen Produktgröße. Alle aufgeführten *stem-loop primer* (stlp) für die spezifische cDNA-Synthese und die zugehörigen qPCR-Primer (*forward* [fwr]) wurden von der Firma Merck erworben. Alle Primer wurden bei einer Annealingtemperatur von 60 °C verwendet.

Bezeichnung	Sequenz	Produktgröße [bp]
hsa-miR-15a-5p stlp	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACG ACCACAAA	59
hsa-miR-15a-5p qPCR fwr	GCCCTAGCAGCACATAATGG	
hsa-miR-29a-3p stlp	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACG ACTAACCG	61
hsa-miR-29a-3p qPCR fwr	GCCCTAGCACCATCTGAAATC	
hsa-miR-34a-5p stlp	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACG ACACAACC	60
hsa-miR-34a-5p qPCR fwr	GCCCTGGCAGTGTCTTAGCT	
hsa-miR-143-3p stlp	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACG ACGAGCTA	59
hsa-miR-143-3p qPCR fwr	GCCCTGAGATGAAGCACTG	

hsa-miR-146-5p stlp	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACG ACAACCCA	
hsa-miR-146-5p qPCR fwd	GCCTGAGAACTGAATTCCA	60
hsa-miR-150-5p stlp	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACG ACCACTGG	
hsa-miR-150-5p qPCR fwd	GCCTCTCCCAACCCTTGT	60
hsa-miR-155-5p stlp	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACG ACAACCCC	
hsa-miR-155-5p qPCR fwd	GCCTTAATGCTAATCGTGATA	61
hsa-miR-181b-5p stlp	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACG ACACCCAC	
hsa-miR-181b-5p qPCR fwd	GCCCAACATTCATTGCTGTCTG	60
hsa-miR-191-5p stlp	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACG ACCAGCTG	
hsa-miR-191-5p qPCR fwd	GCCCAACGGAATCCCAAAG	59
hsa-miR-1281 stlp	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACG ACGGAGAG	
hsa-miR-1281 qPCR fwd	GCCCTCGCCTCCTCC	60
hsa-miR-1825 stlp	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACG ACGGAGAG	
hsa-miR-1825 qPCR fwd	GCCCTCCAGTGCCCTC	59
miR-5571-5p stlp	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACG ACGGGAGG	
miR-5571-5p qPCR fwd	GCCCCAATTCTCAAAGGAG	58
RNU48 stlp	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACG ACGGTCAG	
RNU48 qPCR fwd	GCCACTCTGAGTGTGTCTGCTG	83
<i>universal stlp</i>	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA	

Die in der folgenden Arbeit genutzten mikroRNAs werden zugunsten der besseren Übersicht lediglich mit ihrer Nummer, z.B. miR-15a, benannt. Ihre detaillierten Bezeichnungen sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 7: Die hier verwendeten mikroRNA-Abkürzungen mit ihrer detaillierten Nomenklatur.

detaillierte mikroRNA-Nomenklatur	
miR-15a	hsa-miR-15a-5p
miR-34a	hsa-miR-34a-5p
miR-143	hsa-miR-143-3p
miR-150	hsa-miR-150-5p
miR-181b	hsa-miR-181b-5p
miR-1281	hsa-miR-1281
miR-1825	hsa-miR-1825
miR-5571	hsa-miR-5571-5p

Tab. 8: Verwendete Primer mit den entsprechenden Sequenzen (*forward* [fwr] und *reverse* [rev]) und der zugehörigen Produktgröße. Alle aufgeführten Primer wurden von der Firma Merck erworben. Alle Primer wurden bei einer Annealingtemperatur von 60 °C verwendet.

Bezeichnung	fwr	rev	Produktgröße [bp]
β-Aktin	CACCATTGGCAATGAGCGGTTC	AGGTCTTTGCGGATGTCCA CGT	135
CD11b	CAGCCTTTGACCTTATGTCATGG	CCTGTGCTGTAGTCGCACT	188
CD11c	CGTTCGACACATCCGTGTA	TTTGCCTCCTCCATCATTTTC	217
GAPDH	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGC CAA	131
PTTG1	CGATGCCCCACCAGCCTTACC	CAAGCTCTCTCTCCTCGTCA AGG	317
p50	GCAGCACTACTTCTTGACCACC	TCTGCTCCTGAGCATTGAC GTC	130
p65	ATCTGCCGAGTGAACCGAAACT	CCAGCCTGGTCCCGTGAAA	114

2.6. Antikörper

Tab. 9: Verwendete Antikörper mit dem gebundenen Fluorochrom und dessen Hersteller.

Bezeichnung	Fluorochrom	Hersteller
CD3 Monoclonal Antibody, Klon OKT3	<i>functional grade</i>	Thermo Fisher Scientific
CD3, anti-human, Klon REA613	FITC	Miltenyi Biotec
CD4, anti-human, Klon VIT	PerCP	Miltenyi Biotec
CD8, anti-human, Klon REA734	PE-Vio 615	Miltenyi Biotec
CD8, anti-human, Klon REA734	VioBlue	Miltenyi Biotec
CD11b, anti-human, Klon REA713	PE	Miltenyi Biotec
CD11c, anti-human, Klon MJ4-27G12	FITC	Miltenyi Biotec

CD14, anti-human, Klon REA599	FITC	Miltenyi Biotec
CD25, anti-human, Klon 4E3	APC	Miltenyi Biotec
CD34, anti-human, Klon 561	Brilliant Violet 785™	BioLegend
CD45, anti-human, Klon HI30	PE-Cy7	BioLegend
CD71, anti-human, Klon REA902	PE-Vio®770	Miltenyi Biotec
CD86, anti-human, Klon REA968	APC	Miltenyi Biotec
CD107a, anti-human, Klon REA792	FITC	Miltenyi Biotec
CD117, anti-human, Klon 104D2	Brilliant Violet 421™	BioLegend

2.7. MikroRNA-mimics

Tab. 10: Verwendete mikroRNA-mimics und deren Hersteller.

Bezeichnung	Hersteller
<i>MISSION® microRNA Mimic hsa-miR-15a</i>	Merck
<i>MISSION® microRNA Mimic hsa-miR-34a</i>	Merck
<i>MISSION® microRNA Mimic hsa-miR-143</i>	Merck
<i>MISSION® microRNA Mimic hsa-miR-150</i>	Merck
<i>MISSION® microRNA Mimic hsa-miR-181b</i>	Merck
<i>MISSION® microRNA Mimic hsa-miR-1281</i>	Merck
<i>MISSION® microRNA Mimic hsa-miR-1825</i>	Merck
<i>MISSION® microRNA Mimic hsa-miR-5571</i>	Merck
<i>MISSION® microRNA Mimic Negative Control 1</i>	Merck

2.8. Zellen

Die hämatopoetische Zelllinie THP-1 wurde freundlicher Weise von Institut für Immunologie, Halle (Saale), und die MDS-L-Zellen von Dr. Kaoru Tohyama, Institut für Laboratoriumsmedizin (Hämatologie), Kawasaki Medical School in Japan, zur Verfügung gestellt.

Die *Buffy Coats* zur Gewinnung der peripheren mononukleären Zellen (PBMC) wurden von der Einrichtung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Halle (Saale) bereitgestellt. Nicht-MDS-Knochenmarkzellen wurden mit freundlicher Genehmigung des Instituts für Anatomie und Zellbiologie, Halle (Saale), und mit Hilfe der ansässigen Präparator*innen bzw. medizinischen Doktorand*innen alsbald möglich nach Eintreten des Todes von 20 Körperspender*innen entnommen.

Zusätzlich wurden 3 Nicht-MDS-Knochenmarkzellen von *Caltag Medsystems* und 2 weitere von Lonza käuflich erworben.

Die MDS-Knochenmarkzellen (30 Proben) wurden kommerziell von der *Finnish Hematology Registry and Clinical Biobank (FHRB Biobank)* erworben. Bei allen 35 erworbenen Proben handelte es sich um kryokonservierte mononukleäre Zellen des Knochenmarks.

2.9. Software

Tab. 11: Verwendete Software und deren Hersteller.

Bezeichnung	Hersteller
<i>Excel</i>	Microsoft
<i>FlowJo Version 10.8.1</i>	Becton, Dickinson and Company (BD)
<i>GraphPad Prism 7.05</i>	Graphpad Software, Inc
<i>ImageJ</i>	Wayne Rasband

2.10. Sonstiges

Tab. 12: Verwendete Hilfsmittel und deren Hersteller.

Bezeichnung	Hersteller
<i>Cell lifter</i> , steril	Corning
FACS-Röhrchen (Rundboden-Röhrchen)	VWR
Falcon® Rundboden-Röhrchen, mit 35 µm Zellsieb-Kappenverschluss	Corning
Falcon® 100 µm Zellsieb	Corning
Falconröhrchen, 15 und 50 ml	Merck
Leucosep Röhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One
<i>LS Columns</i>	Miltenyi Biotec
Novex™ WedgeWell™ 4 bis 20 %, Tris-Glycin, 1,0 mm, Mini-Protein-Gele	Thermo Fisher Scientific
Pre-Separation Filter (70 µm)	Miltenyi Biotec
Zellkulturflaschen/-platten	Greiner Bio-One

2.11. Statistik

Für die statistische Auswertung wurde die *GraphPad Prism Software Version 7.05* verwendet. Nach der Überprüfung der Normalverteilung wurde für die Zellkulturexperimente ein gepaarter t-Test durchgeführt. Bei einer nicht-Normalverteilung wurde der Mann-Whitney U-Test angewendet. Für die statistische Analyse der Knochenmarkproben wurde bei einer Normalverteilung der Werte der ungepaarte t-Test bzw. auch hier bei einer nicht-Normalverteilung der Mann-Whitney U-Test verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte in Balkendiagrammen oder *dot plots* $\pm$ der Standardabweichung (SD) angegeben. Falls vorhanden, sind die Signifikanzen in der Abbildung mit dem zugehörigen p-Wert gekennzeichnet.

3. Methoden

3.1. Zellkultur – Zelllinien

3.1.1 Anzucht und Vermehrung der Zellen

Die Zelllinien THP-1 und MDS-L wurden im Allzweckzellkulturmedium RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) mit 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin (P/S) und 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FBS) bei 37 °C und 5 % CO₂ (Standardbedingungen) kultiviert. Die THP-1-Zellen wurden mit einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen pro ml ausgesät und alle zwei bis drei Tage passagiert. Die MDS-L-Zellen hingegen wurden mit einer Dichte von $(0,75-1) \times 10^6$ Zellen pro ml ausgesät und alle fünf Tage passagiert. Zusätzlich erhielten die MDS-L-Zellen alle zwei bis drei Tage 10 ng/ml humanes rekombinantes Interleukin-3 (IL-3). Die Vitalität der Zellen wurde bei jeder Zellzählung mit der Neubauer Zählkammer und Trypanblau kontrolliert. Ebenso wurden regelmäßig Mykoplasmentests durchgeführt. Weitere Details zu den Zelllinien finden sich im Anhang (Anhang-Tabelle 1).

3.1.2 Transfektion der Zelllinien

Um die kommerziell erhältlichen *MISSION® microRNA mimics* zu transfizieren, wurde das Polymer-basierte Transfektionsverfahren mittels *Viromer®GREEN* genutzt. Hierbei werden aus dem Reagenz und dem zu transfizierenden mikroRNA-*mimic* Komplexe gebildet, die durch den natürlichen Prozess der Endozytose in die Zelle gelangen. Bereits ca. 5 h nach Ansetzen der Reaktion, werden die transfizierten Moleküle im Zytosol freigesetzt und stehen dem Metabolismus zur Verfügung.

Für die Durchführung der Transfektion wurden zunächst 1×10^6 der zu transfizierenden Zellen auf zwei ml kompletten Kulturmedium in 6-well-Platten (1 % P/S, 10 % FBS und für MDS-L mit 10 ng/ml IL-3) ausgesät. Anschließend wurden mit Hilfe des *Viromer®GREEN*-Puffers 20 µl einer 11 µM mikroRNA-*mimic* Lösung hergestellt. Nachfolgend wurden 2 µl des *Viromer®GREEN*-Reagenz vorgelegt, mit 180 µl *Viromer®GREEN*-Puffer gemischt. 180 µl dieser Lösung wurden zu den 20 µl der mikroRNA-*mimic* Verdünnung pipettiert und zügig resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl des mikroRNA-*mimic*-Reagenz-Gemisches zu den 2 ml Kultur der entsprechenden Zellen pipettiert und für 48 h unter Standardbedingungen kultiviert. Vor dem Einsatz dieser transient transfizierten Zellen in weiterführenden Experimenten wurden sie zwei Mal mit RPMI-1640 Medium oder phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) für 5 min bei Raumtemperatur (RT) und 300 x g gewaschen.

3.1.3 Differenzierungsassay der Zelllinien

Zur Evaluation des Einflusses von überexprimierten mikroRNA-Kandidaten auf das Differenzierungsverhalten wurden zunächst mikroRNA-*mimics*, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, transfiziert und die Zellen anschließend mit bekannten Differenzierungsreagenzien für weitere 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ in 6-well-Platten inkubiert. Die einzusetzenden Konzentrationen der Reagenzien all-*trans*-Retinsäure (ATRA), Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und VitaminD₃ (VitD₃) wurden im Vorfeld durch zelllinienspezifische Konzentrationsreihen bestimmt (siehe Anhang-Abbildung 1). Die folgende Tabelle gibt die letztlich für die Differenzierungsassays genutzten Konzentrationen wieder.

Tab. 13: Die aus Konzentrationsreihen ermittelten zelllinienspezifischen Konzentrationen (c) der Differenzierungsreagenzien. Bei beiden Zelllinien wurden 1000 nM ATRA für weiterführende Experimente genutzt. Wohingegen die MDS-L-Zellen mit 81 nM PMA und die THP-1-Zellen mit nur 32 nM PMA behandelt wurden. Für die VitD₃-Stimulation wurden nur die THP-1-Zellen verwendet.

	MDS-L	THP-1
C _{ATRA}	1000 nM	1000 nM
C _{PMA}	81 nM	32 nM
C _{VitD3}	-	500 nM

Zusätzlich wurden die THP-1-Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit PMA ein Mal mit Medium gewaschen, für 5 min bei Raumtemperatur (RT) und 300 x g zentrifugiert und anschließend für weitere 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Dies wird im Folgenden als PMA_{resting} (PMA_r) bezeichnet. Außerdem wurde bei allen Experimenten parallel zu jeder transfizierten, stimulierten Probe eine transfizierte, nicht stimulierte Kontrolle mitgeführt.

Sowohl stimulierte, als auch nicht stimulierte Zellen wurden nach der Inkubation in den *wells* resuspendiert und jeweils in ein 15 ml Greiner Zentrifugenröhrchen überführt. Die *wells* wurden anschließend mit 1 ml PBS gespült, verbliebene Zellen mit einem *Corning® Cell lifter* vorsichtig abgeschabt und ebenfalls in das Sammelröhrchen überführt. Nach Abzentrifugation des Mediums für 5 min bei 4 °C und 300 x g wurden die Pellets in 1 ml PBS resuspendiert und für die weiterführenden Analysen von RNA (siehe 3.5.1) und Oberflächenmarkern (mittels Durchflusszytometrie, siehe 3.3) aufgeteilt. Die RNA-Proben wurden so weit bearbeitet, bis eine Lagerung bei -80 °C möglich war. Wohingegen die durchflusszytometrische Expressionsanalyse der Oberflächenmarker CD11b, CD11c, CD14 und CD86 am *MACSQuant® Analyzer 10* bzw. *MACSQuant® Analyzer 16* unmittelbar angeschlossen wurde.

3.1.4 Proliferationsanalyse der Zelllinien

Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens der Zellen nach Überexpression bestimmter mikroRNA-Kandidaten wurde nach der Transfektion (siehe Abschnitt 3.1.2) das *Click-iT™ EdU-Zellproliferationskit* für Bildgebung, *Alexa Fluor™-647-Farbstoff*, genutzt. Hierbei wird 5-Ethynyl-2'-deoxyuridin (EdU), als Nukleosidanalogue zu Thymidin, während der aktiven DNA-Synthese in diese eingebaut. Durch die Zugabe eines Azids in Form eines *Alexa Fluor™-Farbstoffes* und Kupfer kommt es in Verbindung mit einem Alkin, dem inkorporierten EdU, zu einer Klick-Reaktion. Diese Verbindung kann anschließend durch den gebundenen Farbstoff durchflusszytometrisch visualisiert werden.

Für die Durchführung wurden zunächst die Zellen zum Markieren für 2 h mit 10 µM EdU bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit 3 ml 1 %igem (w/v) bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS und Zentrifugation für 5 min bei RT und 300 x g wurde der Überstand verworfen und das Pellet zur Zellfixierung vorsichtig in 100 µl *Click-iT-fixative* resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation im Dunkeln bei RT folgte ein erneuter Waschschriff wie schon beschrieben. Das entstandene Pellet wurde wiederum zum Zwecke der Zellpermeabilisierung in 100 µl *1x Saponin-based permeabilization and wash reagent* resuspendiert und erneut für 15 min im Dunkeln bei RT belassen. Zu diesem Ansatz wurden schließlich 500 µl *Click-iT-Plus-reaction-cocktail* (siehe Tab. 14) pipettiert, vorsichtig gemischt und für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Schließlich folgte ein letzter Waschschriff, die Resuspension des Pellets in 500 µl *1x Saponin-based permeabilization and wash reagent* und die Analyse am Durchflusszytometer *MACSQuant® Analyzer 10* bzw. *MACSQuant® Analyzer 16*. Für die Messung musste kein Propidiumiodid (PI) zugegeben werden.

Tab. 14: Die Zusammensetzung des *Click-iT-Plus-reaction-cocktails*. Der anhand der Tabelle hergestellte Färbecocktail wurde stets frisch hergestellt und anschließend innerhalb von 15 min verbraucht.

Komponente	Reaktionsansatz 500 µl
PBS	438 µl
<i>Copper protectant</i>	10 µl
<i>Fluorescent dye picolyl azide</i> <i>(Alexa Fluor®647)</i>	2,5 µl
<i>Reaction Buffer Additive (1:10)</i>	50 µl

3.1.5 Zellzyklusanalyse

Zur Untersuchung der Zellzyklusstadien nach Transfektion (siehe Abschnitt 3.1.2) wurden die Zellen mittels PI angefärbt. Dieser fluoreszierende Stoff interkaliert stöchiometrisch zwischen den Basen der doppelsträngigen Nukleinsäuren, was eine Auswertung am Durchflusszytometer ermöglicht. Die so auswertbare Fluoreszenz einer Zelle ist proportional zum DNA-Gehalt dieser und lässt somit Rückschlüsse auf den Zellzyklusstatus einer Zelle bzw. einer ganzen Zellpopulation zu.

Hierfür wurden die Zellen nach der Transfektion wie angegeben mit PBS gewaschen und pelletiert. Durch die Zugabe von 2 ml 70 %igem (v/v) Ethanol unter leichtem Schütteln und die Lagerung bei 4 °C für mindestens 24 h erfolgte die Fixierung. Danach wurden die Zellen zur Permeabilisierung ein Mal mit PBS-Tween (0,5 %, v/v) und ein Mal mit PBS-Zitronensäure-Tween (0,5 %; v/v) gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in 300 µl Ribonuklease-Puffer (RNase-Puffer, 1 mg/ml) aufgenommen und für 10 min bei RT inkubiert. Zu diesem Ansatz wurden letztlich 300 µl PI-Lösung (Endkonzentration: 0,1 mg/ml) zugegeben und weitere 10 min im Dunkeln bei 4 °C belassen. Anschließend konnte der Reaktionsansatz am Durchflusszytometer *MACSQuant® Analyzer 10* bzw. *MACSQuant® Analyzer 16* ausgewertet werden. Eine gesonderte Zugabe von PI direkt vor der Messung war nicht mehr notwendig. Für die mitgeführte PMA-Kontrolle wurden die Zellen nicht transfiziert, sondern für 48 h mit 48 nM PMA stimuliert.

3.2. Primärzellkultur – periphere Zellen

3.2.1 *Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC)*-Isolation

Zur Gewinnung der primären Zellen wurden *Buffy Coats* genutzt. Dies sind Leukozytenkonzentrate, die als Nebenprodukte der Vollblutspende zurückbleiben und für Forschungszwecke genutzt werden können. Aus diesen Konzentraten können mittels Dichtegradientenzentrifugation die peripheren mononukleären Blutzellen (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, kurz PBMCs) isoliert und als lebende Zellen bei -150 °C gelagert werden. Durch die Nutzung eines Gradientenmediums (Biocoll® Trennlösung) mit einer Ausgangsdichte von 1,077 g/ml verbleiben nach Zentrifugation die mononukleären Zellen in der oberen Fraktion mit geringerer Dichte und die Erythrozyten und Zellen mit polymorphen Kernen in der unteren Fraktion von höherer Dichte.

Für die Durchführung wurden zunächst 15 ml Biocoll® Trennlösung in ein 50 ml Leucosep Separationsröhrchen gegeben und für 1 min bei 1000 x g und RT zentrifugiert. Für den Separationsschritt wurden ca. 30 ml des *Buffy Coat- Dulbecco's Phosphate Buffered Solution*

(DPBS)- Gemisches (1:1) vorsichtig auf den Trennfilter des Leucosep Röhrchens pipettiert und für 10 min bei 1000 x g und RT ohne automatische Zentrifugationsbremse zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase, bestehend aus DPBS und Plasma, behutsam abpipettiert und verworfen und die über dem Filter sichtbare Interphase, bestehend aus den PBMCs, mit einer Pasteurpipette in ein frisches, mit 10 ml DPBS gefülltes 50 ml Falconröhrchen überführt. Dieses wurde danach auf 50 ml mit DPBS aufgefüllt und zum Waschen der Zellen für 7 min bei 700 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und ein erneuter Waschschriff mit 20 ml DPBS und einer Zentrifugation für 5 min bei 300 x g und 4 °C schloss sich an. Zu dem Pellet wurde zur Lyse verbliebener Erythrozyten 1 ml Erythrozyten-Lysepuffer gegeben, vorsichtig resuspendiert und ein weiterer Milliliter Puffer dazu pipettiert. Nach 3-minütiger Inkubation auf Eis wurde mit 20 ml DPBS aufgefüllt und für 5 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Zum Schluss wurde das Pellet in 1 ml FBS aufgenommen und die Zellzahl und Vitalität mittels Zählkammer nach Neubauer und Trypanblau ermittelt. Zur Kryokonservierung wurden $(4-5) \times 10^7$ Zellen pro Kryo in 1 ml 90 % (v/v) FBS und 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) eingefroren und bei -150 °C aufbewahrt.

3.2.2 Magnetische Sortierung primärer CD8⁺ T-Zellen

Zur Trennung der primären T-Zellen von den restlichen PBMCs wurde das Prinzip des *Magnetic Activated Cell Sortings* (MACS), der magnetischen Zellseparation, genutzt. Hierbei werden die PBMCs mit sogenannten *MicroBeads* inkubiert. Dies sind Magnetpartikel, an die Antikörper (AK) gebunden sind, die in der Zellsuspension wiederum spezifisch an die entsprechenden Zielzellen binden. Anschließend durchläuft das Zellgemisch eine LS Säule, deren Matrix aus ferromagnetischen Kugeln besteht und die sich einem starken magnetischen Feld befindet. Durch dieses verbleiben die über die Antikörper mit den magnetischen Nanopartikeln gebundenen Zellen in der Säule und die nicht AK-gebundenen Zellen fließen hindurch. Wird das Magnetfeld entfernt, so können auch die mit den magnetischen Nanopartikeln markierten Zellen aus der Säule gespült und für weitere Experimente genutzt werden. Diese Form der Zellisolation wird als positive Selektion bezeichnet, da die markierten Zellen die zu isolierende Zielpopulation darstellen.

Zunächst wurden entsprechende PBMCs aufgetaut. Hierzu wurden die Kryoröhrchen für ca. 3 min im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend mit ca. 1 ml RPMI-1640 im Röhrchen resuspendiert, bevor das gesamte Volumen in ein mit 19 ml Medium vorgelegtes Falconröhrchen überführt wurden. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 300 x g für 5 min und RT, das Verwerfen des Überstandes und erneutes Waschen des Zellpellets in 20 ml Medium. Das verbliebene Zellpellet wurde in 1 ml kaltem MACS-Puffer resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Bei der weiteren Durchführung ist zu beachten, dass sowohl der Puffer als auch die eingesetzten Geräte zur magnetischen Zelltrennung stets gut gekühlt benutzt

wurden. Nach erneuter Zentrifugation bei 300 x g für 5 min bei 4 °C wurde das Pellet in 900 µl MACS-Puffer resuspendiert und mit 100 µl gut gemischten *CD8 MicroBeads* versetzt. Dieses Zellgemisch wurde für 15 min im Dunkeln bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert, wobei das Röhrchen nach der Hälfte der Zeit ein Mal kurz durch leichtes Schütteln gemischt wurde. In der Zwischenzeit wurde ein Prä-Separationsfilter mit 70 µm Porengröße auf ein 15 ml Falconröhrchen gesteckt und mit 2 ml MACS-Puffer vorinkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation des Zellgemisches wurde dieses mit 7 ml MACS-Puffer aufgefüllt und über den Prä-Separationsfilter gegeben. Sowohl das Röhrchen als auch der Filter wurden anschließend noch mit je 2 ml MACS-Puffer gespült. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 300 x g und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen. Für eine spätere durchflusszytometrische Reinheitsanalyse der Isolation, wurden bei diesem Schritt ca. 10 µl der Zellsuspension in ein mit 1 ml *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS)-Puffer befülltes FACS-Röhrchen überführt. Für die eigentliche Trennung wurden LS Säulen am *QuadroMACS® Separator* angebracht und mit 5 ml MACS-Puffer äquilibriert. Danach wurde ein frisches 15 ml Falconröhrchen unter der Säule positioniert und die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Nach vollständigem Durchlauf der Flüssigkeit wurden Röhrchen und Säule mit ca. 5 ml MACS-Puffer nachgespült. Das Auffangröhrchen mit der so erhaltenen Negativfraktion wurde verschlossen auf Eis gelagert, während das 15 ml Falconröhrchen für die Positivfraktion außerhalb des *QuadroMACS® Separators* positioniert wurde. Schließlich wurde die LS Säule aus dem Magnetständer entfernt, in das Gefäß für die Positivfraktion gesetzt und mit 5 ml MACS-Puffer befüllt. Mit Hilfe des Säulenstempels konnte am Ende die Fraktion mit den CD8⁺ T-Zellen aus der Säule gedrückt werden. Beide Fraktionen wurden bei 300 x g für 5 min und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets in je 1 ml MACS-Puffer aufgenommen. Auch an diesem Schritt wurden für die Reinheitsanalyse ca. 50 µl jeder Fraktion in je ein FACS-Röhrchen überführt. Zusätzlich wurden Zellzahl und Vitalität der Zellen der Positivfraktion mit Hilfe von Trypanblau und der Neubauer-Zählkammer ermittelt.

Für die Ermittlung der Reinheit der Positivfraktion wurden die Stichproben von vor der Trennung, der Negativfraktion und der Positivfraktion mit fluoreszenzmarkierten Anti-CD3-, Anti-CD4- und Anti-CD8-Antikörpern inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch ausgewertet. Die so erhaltenen reinen CD8⁺ T-Zellen konnten dann für weiterführende Experimente genutzt werden. Eine Liste mit Details zu den Spendern der hierfür genutzten PBMCs findet sich im Anhang (Anhang-Tabelle 2).

3.2.3 Transfektion primärer CD8⁺ T-Zellen

Für die Überexpression bestimmter mikroRNA-*mimics* wurde wie schon für die Zelllinien das Polymer-basierte Transfektionsreagenz *Viromer®GREEN* verwendet. Das Transfektionsprotokoll für primäre CD8⁺ T-Zellen entspricht größtenteils dem der Zelllinien. Die transfizierten T-Zellen wurden allerdings in *X-Vivo*-Medium mit 500 U IL-2 pro ml kultiviert. Bei *X-Vivo* handelt es sich um ein serumfreies Medium speziell für hämatopoetische Zellen. Um den toxischen Einfluss des *Viromer*-Reagenzes so gering wie möglich zu halten, wurden die transfizierten T-Zellen 7 h nach Ansetzen der Transfektion ein Mal mit 5 ml *X-Vivo*-Medium gewaschen, für 5 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert und das Pellet wieder in 2 ml *X-Vivo*-Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 500 U IL-2 pro ml wurden die Zellen für weitere 41 h unter Standardbedingungen kultiviert.

3.2.4 Kokultur zwischen CD8⁺ T-Zellen und hämatopoetischen Zelllinien

Um das Proliferationsverhalten primärer T-Zellen in Gegenwart der hämatopoetischen Zelllinien zu untersuchen, wurden Kokulturen durchgeführt. Hierfür wurden die isolierten und mit dem fluoreszierenden Zellfärbungsstoff Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) angefärbten primären T-Zellen und die Zelllinien THP-1 bzw. MDS-L gleichzeitig in den *wells* der Zellkulturplatte kultiviert. CFSE bindet intrazellulär an Lysin und andere Aminogruppenreste und wird bei einer Zellteilung zur Hälfte an die Tochterzellen weitergegeben. Dies wiederum hat zur Folge, dass die Fluoreszenzintensität mit zunehmender Zellteilung abnimmt und die CFSE-Färbung sich somit für Proliferationsanalysen eignet. Die MDS-L- und THP-1-Zellen wurden zur besseren Identifizierung bei der durchflusszytometrischen Analyse ebenfalls mit einem Zellfarbstoff, *Vybrant®Dil* Zellkennzeichnungslösung, angefärbt und zusätzlich im Vorfeld mit einer Strahlendosis von 30 Gy bestrahlt. Letzteres sollte eine zu starke Proliferation der Zellen und somit Überwucherung der T-Zellen über den Zeitraum der Kokultur verhindern. Im genannten Modellsystem kamen auch mit mikroRNA-*mimics* transfizierte T-Zellen zum Einsatz.

Zunächst mussten am Vortag des Ansetzens der Kokultur die *wells* einer 96-*well*-Platte für die Positivkontrolle mit Anti-CD3-Antikörper beschichtet werden. Dazu wurden 100 µl des monoklonalen Anti-CD3-Antikörpers OKT3 (1 µg/ml) in die jeweiligen Vertiefungen vorgelegt, die Platte mit Parafilm abgedichtet und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Für die Durchführung am Folgetag wurden die, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, frisch isolierten primären T-Zellen zunächst mit CFSE angefärbt. Hierfür wurde 1 ml Zellsuspension in DPBS mit 0,2 % (w/v) FBS und 0,5 µM CFSE für 10 min bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubiert.

Anschließend wurden 5 ml kaltes RPMI-1640 (10 % FBS, v/v) zugegeben und die Suspension für weitere 5 min auf Eis im Dunkeln belassen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 300 x g wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1 ml X-Vivo-Medium resuspendiert und im Dunkeln bei 4 °C gelagert. Für die Färbung der Partnerzellen MDS-L und THP-1 wurden jeweils 1×10^6 Zellen in 1 ml FBS-freiem RPMI-1640 und 5 μ l Vybrant®Dil Zellkennzeichnungslösung gemischt und für 5 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen jeweils 3-mal mit FBS-freiem RPMI-1640 gewaschen und für 5 min bei 300 x g und RT zentrifugiert. Schließlich wurden auch diese Zellen in 1 ml X-Vivo-Medium aufgenommen. Zum eigentlichen Ansetzen der Kokultur und ihrer Kontrollen wurde zunächst der Beschichtungsantikörper vom Vortag abgenommen und als Verdunstungsschutz die äußeren wells der Platte mit jeweils 100 μ l sterilem Wasser befüllt. Dann wurde in den entsprechenden wells zunächst 100 μ l X-Vivo-Medium für die Negativkontrollen und Positivkontrollen bzw. 100 μ l X-Vivo mit 5×10^4 Zellen der hämatopoetischen Zelllinien vorgelegt. Danach wurden 100 μ l mit 1×10^5 T-Zellen dazugegeben, sodass pro well ein Endvolumen von 200 μ l mit einer Effektor-Target-Ratio von 2:1 vorhanden war. Die Positivkontrollen wurden schließlich mit 500 U/ml IL-2 und die wells der Kokultur mit 0,5 (für THP-1-Zellen) bzw. 1 μ g/ml Phythämagglutinin (PHA) (für MDS-L-Zellen) stimuliert. Nach 5-tägiger Kultivierung konnten die Kulturen sowohl mikroskopisch als auch durchflusszytometrisch analysiert werden. Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse wurden sowohl die Expression der T-Zelloberflächenmarker CD25 und CD71 als auch das Proliferationsverhalten der T-Zellen untersucht.

3.2.5 T-Zellproliferation

Neben dem Einsatz primärer CD8⁺ T-Zellen in Kokulturen mit hämatopoetischen Tumorzellen wurden diese auch zur Proliferationsanalyse nach Transfektion verschiedener mikroRNA-*mimics* eingesetzt. Hierfür wurden die isolierten primären CD8⁺ T-Zellen wie unter 3.2.3 erläutert transfiziert, um anschließend in 96-well-Platten für weitere fünf Tage unter verschiedenen Konditionen weiter inkubiert zu werden. Im Anschluss daran, wurde das Proliferationsverhalten sowie die Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD71 durchflusszytometrisch ausgewertet.

Für die Durchführung wurden die stimulierten transfizierten T-Zellproben wie die unter 3.2.4 beschriebenen Positivkontrollen und die unstimulierten transfizierten T-Zellproben wie die unter 3.2.4 beschriebenen Negativkontrollen angesetzt und ausgewertet.

3.2.6 CD107a-Aktivierungsassay CD8⁺ T-Zellen

Für die Analyse des Degranulationsverhaltens der isolierten und transfizierten CD8⁺ T-Zellen wurden diese mit MDS-L-Zellen aus der Kultur für 4 h inkubiert. Anschließend wurde deren Oberflächenexpression des zytotoxischen Degranulationsmarkers CD107a (LAMP-1) durchflusszytometrisch ermittelt.

Für die Durchführung des Assays wurden die seit 48 h transfizierten CD8⁺ T-Zellen gewaschen und jeweils in frischem X-Vivo-Medium resuspendiert, sodass eine Endkonzentration von 1×10^5 CD8⁺ T-Zellen pro 100 µl Medium erreicht wurde. Parallel dazu wurden in 96-well-Plattenvertiefungen jeweils 5×10^4 MDS-L-Zellen pro 100 µl X-Vivo vorgelegt und schließlich 100 µl der T-Zellen zugegeben. Zu den Positivkontrollen wurden umgehend 32 nM PMA und 500 ng/ml Ionomycin zugegeben. Letztendlich wurde allen wells 2 µl des Anti-CD107a-FITC-Antikörpers zugefügt. Dieser Ansatz wurde dann für 1 h bei 37 °C unter Standardbedingungen inkubiert. Nach der ersten Inkubation wurde allen wells 13 µl einer 1:100 Verdünnung des *BD GolgiStop™ Protein Transport Inhibitor (Containing Monensin)* zugegeben und es folgte eine Inkubation für weitere drei Stunden bei 37 °C. Nach insgesamt vierstündiger Inkubation wurden die wells resuspendiert und wie unter 3.3. beschrieben mit Anti-CD8 gefärbt, bevor die Analyse am Durchflusszytometer folgte.

3.3. Antikörperfärbung für die durchflusszytometrische Analyse

Für die Analyse am Durchflusszytometer wurden die Zellen zunächst in FACS-Röhrchen vorgelegt, mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und für 5 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zum verbliebenen Zellpellet wurde 1 µl *FcR Blocking Reagent* pipettiert und für 5 min auf Eis inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die zu färbenden Antikörpermischungen nach Herstellerangaben und mit FACS-Puffer hergestellt, sodass das finale Färbenvolumen von 100 µl pro FACS-Röhrchen zugegeben und kurz gemixt werden konnte. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis und im Dunkeln wurde wie schon zu Beginn mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde wieder verworfen, das Pellet in 350 µl FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Messung auf Eis und im Dunkeln gelagert. Für jede Zellprobe wurde parallel eine ungefärbte Probe mitgeführt.

Kurz vor der Messung am *MACSQuant® Analyzer 10* bzw. *MACSQuant® Analyzer 16* wurden zum Ausschluss der toten Zellen 3,5 µl Propidiumiodid (100 µg/ml) zugegeben.

3.4. Primärzellen – Knochenmarkzellen

3.4.1 Gewinnung der Knochenmarkzellen aus Körperspendern

Für die Gewinnung der Knochenmarkzellen aus Körperspendern wurden diese durch die Präparator*innen des Instituts für Anatomie und Zellbiologie und/oder dort arbeitende medizinische Doktorand*innen am hinteren Beckenkamm punktiert. Das erhaltene Aspirat wurde zu 20 ml in mit jeweils 2 ml EDTA (wässrige Lösung, 16 mg/ml, steril) befüllte Spritzen aufgezogen und vermischt. Anschließend wurden, identisch zu den *Buffy Coat*-Proben bezogen von der Transfusionsmedizin (siehe 3.2.1), die mononukleären Zellen aus den Proben isoliert.

Vor der eigentlichen Isolation wurden die Proben zunächst für 10 min bei 350 x g und RT zentrifugiert. Durch die so entstandene Phasentrennung zwischen Blutzellen und Plasma konnte letzteres abgenommen und wiederum für 15 min bei 2000 x g und RT zentrifugiert werden. Das letztlich komplett von Zellen befreite Plasma wurde schließlich zu 1 ml aliquotiert und bei -80 °C für aufbewahrt. Die zellulären Bestandteile wurden aufgrund der fettigen und zum Teil bröckligen Konsistenz zunächst über einen Zellfilter mit 100 µm Porengröße gegeben, bevor die Aspiration auf die Trennröhrchen verteilt wurden. Trotz dieses Filterschrittes konnten sich bei einigen Proben nur ungenügende Phasen im eigentlichen Separationsschritt bilden, weshalb bei benannten Proben dieser Schritt wiederholt werden musste. Die weitere Durchführung entspricht wieder der der Prozedur *Buffy Coats*.

3.4.2 Antikörperfärbung der Knochenmarkzellen für die Zellsortierung

Die aufgetauten Knochenmarkzellen wurden mit Antikörpern für folgende Oberflächenmarker markiert: CD3, CD4, CD8, CD34, CD45 und CD117. Das Färbeprotokoll entspricht weitestgehend dem unter Abschnitt 3.3. genannten Protokoll. Die gefärbten Knochenmarkzellen wurden nach der Färbung allerdings noch über einen 35 µm Filter gegeben und zu 2×10^6 Zellen pro 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Außerdem wurde kurz vor der Messung am Hochleistungssorter Aria II zum Ausschluss der toten Zellen DAPI (Endkonzentration 0,2 µg/ml) zugegeben.

3.4.3 MikroRNA-Microarray Analysen mittels *GeneChip™ miRNA 4.0 Array*

Nach dem Auftauen der kryokonservierten mononukleären Zellen des Knochenmarks wurden die Zellen in der *Core Facility* Durchflusszytometrie der Universitätsmedizin Halle sortiert. Dabei wurden die Zellen am Hochleistungszellsorter Aria II analysiert und die CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen zu je 15000 Zellen in bereits mit selbst hergestellten Trizol befüllte Röhrchen sortiert.

Anschließend wurde die RNA nach 3.5.2 isoliert und diese dann zur *Microarray*-Analyse am *Affymetrix GeneChip Scanner 7G* in die *Core Facility* Analyse der Universitätsmedizin Halle übergeben.

3.5. Molekularbiologische Methoden

3.5.1 RNA-Isolation mittels *NucleoSpin® miRNA-Kit*

Zur Isolation der RNA der Zelllinienexperimente wurde das *NucleoSpin® miRNA Kit* von Macherey Nagel (MN) genutzt. Hierbei handelt es sich um ein säulenbasiertes Isolationsverfahren ohne Phenol.

Hierfür wurden die mit PBS gewaschenen Zellen in 300 µl Lysepuffer ML (MN) vermischt, kräftig gemixt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch auf einen *NucleoSpin®*-Filter gegeben und für 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Zum Durchfluss wurden 150 µl Ethanol (absolut) gegeben, wiederum kräftig gemixt und für 5 min bei RT belassen. Nach Zugabe des Gemisches auf eine *NucleoSpin®*-RNA-Säule folgte ein Zentrifugationsschritt für 1 min bei 11000 x g. Der Durchfluss mit den kleinen RNA-Molekülen und Proteinen wurde gesichert und zunächst zur Seite gestellt. Die Säule mit den gebundenen großen RNA-Molekülen und der DNA wurde mit 350 µl Membranentsalzungspuffer MDB (MN) für 1 min bei 11000 x g und RT zentrifugiert. Im Anschluss wurden 100 µl rDNase auf die Säule pipettiert und für mind. 15 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde zum gesicherten Durchfluss mit den kleinen RNA-Molekülen 300 µl Proteinpräzipitationspuffer MP (MN) zugegeben mit einer nachfolgenden Zentrifugation bei 11000 x g für 3 Minuten. Der entstandene proteinfreie Überstand wurde anschließend auf eine *NucleoSpin® Protein removal*-Säule gegeben und wiederum für 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 800 µl *Binding Buffer* MX (MN) vermischt. Von diesem Gemisch wurden 600 µl auf die mit rDNase inkubierte *NucleoSpin®*-RNA-Säule gegeben und für 30 s bei 11000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Schritt zwei Mal wiederholt, bis das komplette Lysat die Säule passiert hat. Schließlich folgten noch Waschschriffe der Säule, zunächst mit 600 µl Waschpuffer M1 (MN) und danach mit 700 µl Waschpuffer M2 (MN). Jedes Mal mit einem Zentrifugationsschritt von 30 s bei 11000 x g. Der dritte Waschgang der Membran erfolgte mit 250 µl Waschpuffer M2 (MN) für 2 min bei 11000 x g. Zur finalen Elution der gesamten RNA wurden 30 µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben, für 1 min bei RT inkubiert und schließlich für 30 s bei 11000 x g zentrifugiert. Zur Erhöhung der RNA-Ausbeute wurde der letzte Schritt ein Mal wiederholt. Die erhaltene RNA wurde umgehend auf Eis gelagert und die Konzentration am Mikroplattenleser *BioTekSynergy* gemessen.

3.5.2 RNA-Isolation mittels selbst hergestelltem Trizol

Für die RNA-Isolation der Knochenmarkproben wurde selbst hergestelltes, maximal 14 Tage altes, Trizol verwendet.

Die zu isolierenden Knochenmarkzellen wurden unmittelbar zu 15000 Zellen in 400 µl Trizol sortiert. Nach intensiver Mischung wurden weitere 600 µl Trizol zugegeben und erneut gemixt. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugegeben, das Ganze kräftig geschüttelt und für 3 min bei RT inkubiert. Danach folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 15000 x g für 15 min. Die so entstandene obere wässrige Phase wurde dann in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt. Darauf wurde dann die gleiche Menge an eisgekühltem Isopropanol gegeben. Für eine hohe Rückgewinnung der RNA wurde außerdem Glykogen (RNA-Qualität, Endkonzentration 0,05 µg/µl) zugegeben. Nach der RNA-Fällung bei -20 °C für mind. 24 h wurde das Gemisch für 10 min bei 4 °C und 15000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen und das Pellet mit 1 ml kalten Ethanol (70 %ig, v/v) gewaschen. Darauf folgte eine Zentrifugation von 10 min bei 4 °C und 15000 x g und erneutes Verwerfen des Überstandes. Dieser Waschschrift wurde wiederholt, allerdings nur mit einem 5-minütigen Zentrifugationsschritt. Zum Schluss wurde das Pellet für 10 min der *Speedvac* getrocknet und in 12 µl Ampuwa-Wasser gelöst. Eine Bestimmung der RNA-Konzentration und die Überprüfung der RNA-Integrität wurde stichprobenartig am *2100 Bioanalyzer Instrument* in der *Core Facility* Analyse des UKH durchgeführt. Aufgrund der geringen Konzentrationen der Proben wurde hier umgehend die cDNA-Synthese angeschlossen ohne die RNA vorher einzufrieren.

3.5.3 Reverse Transkription – cDNA-Synthese

Um die vorhandene RNA in der *real-time* PCR (qPCR) vervielfältigen zu können, musste sie zunächst mittels reverser Transkriptasereaktion in cDNA umgeschrieben werden. Dafür wurden die Komponenten der folgenden Tabelle in der angegebenen Reihenfolge pipettiert.

Tab. 15: Pipettierschema der cDNA-Synthese mit *random hexamer primer*.

Reagenz	V [20 µl]
5X Reaktionspuffer	4 µl
dNTP-Gemisch (je 10 mM)	2 µl
RNase-Inhibitor	1 µl
miRNA-spezifische <i>stem-loop primer</i> (1 µM)	je 1 µl
Probe (500 ng bis 1 µg)	x µl
Ampuwa-Wasser	x µl
<i>RevertAid H Minus reverse</i> Transkriptase	1 µl

MikroRNAs sind aufgrund ihrer Länge von 17-24 Nukleotiden zu kurz für Standard-PCR-Methoden, daher musste für die Analyse der mikroRNAs eine gesonderte Umschreibung der RNA angewendet werden. Hierbei wurden sogenannte *stem-loop primer* eingesetzt. Diese Primer besitzen eine 44 Nukleotid lange konstante Region, die für alle Primer identisch ist und einen *stem-loop* bildet. Daran befinden sich 6 variable Nukleotide, die wiederum für jede mikroRNA individuell sind. Durch diesen *stem-loop* Anteil wird die mikroRNA schließlich so verlängert, dass eine weitere Analyse mit den traditionellen PCR-Methoden keine Hürde mehr darstellt. Bis zu fünf solcher mikroRNA-spezifischen *stem-loop primer* können pro cDNA-Synthese-Ansatz parallel zugegeben werden. Tabelle 16 stellt das zugehörige Pipettierschema dar.

Tab. 16: Pipettierschema der cDNA-Synthese mit miRNA-spezifischen *stem-loop primern* pro Ansatz.

Reagenz	V [20 µl]
5X Reaktionspuffer	4 µl
dNTP-Gemisch (je 10 mM)	2 µl
RNase-Inhibitor	1 µl
<i>random hexamer primer</i>	1 µl
Probe (500 ng bis 1 µg)	x µl
Ampuwa-Wasser	x µl
<i>RevertAid H Minus reverse Transkriptase</i>	1 µl

Da für die aus den Knochenmarkproben gewonnenen RNA-Proben keine Konzentrationsbestimmung vorlag, wurden hier standardmäßig 7 µl in die *stem-loop*-PCR eingebracht und anschließend auf das *Housekeeper*-Gen RNU48 normalisiert.

Die Reaktionsansätze wurden nach folgenden Programmen im Thermozykler inkubiert.

Tab. 17: Thermozyklerprogramme der cDNA-Synthese mit (A) *random hexamer primer* bzw. (B) miRNA-spezifischen *stem-loop primern*.

A

Temperatur [°C]	Zeit [h:min:s]
25	00:05:00
42	01:00:00
70	00:05:00
4	∞

B

Temperatur [°C]	Zeit [h:min:s]
16	00:30:00
42	00:30:00
85	00:05:00
4	∞

--

Die aus dem *random hexamer*-Programm erhaltene cDNA wurde im Anschluss 1:2 mit Ampuwa-Wasser verdünnt und, wie auch die *stem-loop* cDNA, bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.5.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Zur Vervielfältigung spezifischer Abschnitte der cDNA aus Schritt 3.5.3 wurden quantitative Polymerase-Kettenreaktionen (qPCRs) durchgeführt. Dafür wurde zunächst ein Mastermix, wie in Tabelle 18 angegeben, pipettiert. Für die qPCR der cDNA aus der Umschreibung mit dem *random hexamer primer* wurde für jedes zu analysierende Target ein spezifischer *forward* (fwr) und *reverse* (rev) *primer* verwendet. Für die qPCR der cDNA aus der Umschreibung mit den *stem-loop primern* wurde hingegen nur ein für jede mikroRNA spezifischer *forward primer* verwendet. Als *reverse primer* wurde für jede nachzuweisende mikroRNA immer der *universal stem-loop primer* genutzt.

Tab. 18: Pipettierprotokolle der qPCR-Mastermixe für *random hexamer* bzw. *stem-loop* cDNA.

<i>random hexamer</i> cDNA	<i>stem-loop</i> cDNA	Reaktionsansatz (18 µl)
SYBR-Green qPCR SuperMix	SYBR-Green qPCR SuperMix	7,5 µl
Primer fwr (10 µM)	Primer fwr (10 µM)	0,5 µl
Primer rev (10 µM)	<i>universal stem-loop primer</i> (10 µM)	0,5 µl
Ampuwa-Wasser	Ampuwa-Wasser	9,5 µl

Dieser Mastermix wurde in 96-*well*-Platten vorgelegt und mit jeweils 2 µl der entsprechenden cDNA komplettiert. Die qPCR erfolgte für beide Mastermixe schließlich im qTower³G-Thermozykler nach folgendem Programm:

Tab. 19: qPCR-Programm.

Temperatur [°C]	Zeit [h:min:s]
95,0	00:07:00
95,0	00:00:30
primerspezifisch	00:00:30
72,0	00:00:30
72,0	00:05:00
95,0	00:01:00
Schmelzkurve	00:00:06

} 41x

4. Ergebnisse

4.1. Analysen von in MDS differentiell exprimierten miRNAs in zellbiologischen Prozessen der Vorläuferzelllinien MDS-L und THP-1

Für die Analysen der differentiell exprimierten mikroRNAs wurde zum einen die leukämische Vorläuferzelllinie THP-1 und parallel dazu die MDS-Zelllinie MDS-L eingesetzt. Letztere ist kommerziell nicht erwerbbar und eine der wenigen Zelllinien, die tatsächlich aus dem MDS-Stadium und nicht der nachgeschalteten akuten myeloischen Leukämie eines Patienten stammen [107].

4.1.1 Erfolgreiche transiente Überexpression ausgewählter mikroRNA-Kandidaten in den Zelllinien MDS-L und THP-1

Mittels polymerbasierter transienter *MISSION® microRNA mimic*-Transfektion konnten ausgewählte mikroRNA-Kandidaten erfolgreich in MDS-L- und THP-1-Zellen eingebracht werden. Die Überexpression wurde anschließend mittels qPCR validiert und ist in der folgenden Abbildung exemplarisch für drei der untersuchten mikroRNAs dargestellt.

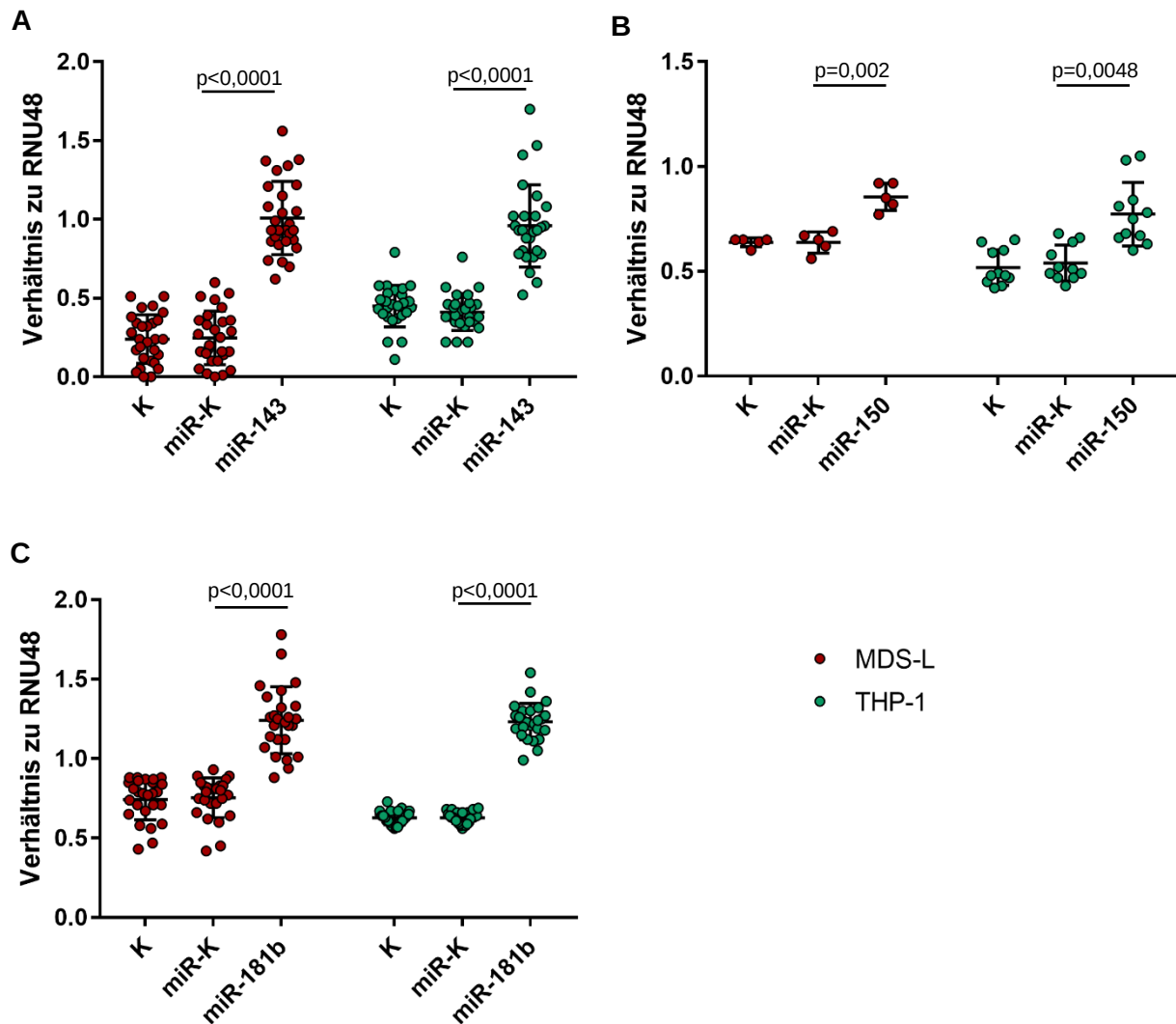


Abb. 4: Überexpression der mikroRNAs miR-143 (A), miR-150 (B) und miR-181b (C) in den Zelllinien MDS-L und THP-1. Dargestellt sind jeweils die Expressionslevel der mikroRNAs in den unbehandelten Kontrollen (K), den mit der *mimic*-Kontrolle transfizierten Proben (miR-K) und den mit *miR-mimics* transfizierten Proben im Verhältnis zum *Housekeeper* RNU48. $n=5-28$; $\pm$ SD; dargestellt ist $p < 0,05$.

In Abbildung 4 sind die Verhältnisse der einzelnen mikroRNAs zum *Housekeeper* RNU48 dargestellt. Es wird deutlich, dass miR-143 von allen drei dargestellten mikroRNAs das geringste Expressionslevel sowohl in MDS-L- als auch in THP-1-Zellen aufweist, wohingegen miR-150 und miR-181b moderate Expressionslevel aufweisen. Alle drei mikroRNAs konnten signifikant in beiden Zelllinien überexprimiert werden. Identisch wurden auch miR-15a und miR-34a transfiziert (Anhang-Abbildung 2). Auch bei diesen beiden mikroRNAs konnten signifikante (miR-15a: THP-1 $p=0,0005$, MDS-L $p=0,0026$; miR-34a: THP-1 und MDS-L $p < 0,0001$) Überexpressionen verzeichnet werden. Hier ist zu erwähnen, dass miR-15a in beiden Zelllinien eine ebenso moderate Basisexpression wie miR-150 und miR-181b vorweist. MiR-34a wird hingegen in THP-1 weitaus geringer und in MDS-L nahezu gar nicht exprimiert.

Wie auch in allen folgenden Experimenten finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untransfizierten Kontrollproben und miR-kontroll-transfizierten Proben, weshalb letztere in den weiterführenden Experimenten als zu vergleichende Kontrollprobe verwendet wurde. Aus diesem Grund ist die untransfizierte Kontrollprobe zum Teil nicht mit aufgeführt, auch wenn sie experimentell stets mitgeführt wurde.

Durch Versuche mit einer unterschiedlichen Anzahl an Waschschritten der Zellen vor RNA-Isolation konnte eine vermeintliche Überexpression durch Anhaften der *mimics* an der Zelloberfläche ausgeschlossen werden.

4.1.2 Differenzierung von MDS-L und THP-1 mit ATRA und PMA, wobei auf VitD₃-Stimulation nur THP-1-Zellen reagieren

Um das Differenzierungsverhalten der leukämischen Zelllinien zu untersuchen, wurde diese für jeweils 48 h mit den etablierten Differenzierungsreagenzien all-*trans*-Retinsäure (ATRA), Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) bzw. VitaminD₃ (VitD₃) behandelt [108–110]. Die Auswertung der Expression der Oberflächendifferenzierungsmarker CD11b, CD11c, CD14 und CD86 auf den unstimulierten Zellen (Kontrolle), sowie den mit dem entsprechenden Lösungsmittel (DMSO oder EtOH) als auch mit dem jeweiligen Reagenz behandelten Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie parallel zur Untersuchung der mRNA-Level von CD11b, CD11c und des Transkriptionsfaktors PTTG1. Dieser Transkriptionsfaktor ist unter anderem in hämatologischen Erkrankungen überexprimiert und kann aber durch den Einsatz von z.B. PMA transkriptionell herunterreguliert werden [111].

Die einzusetzenden Konzentrationen der jeweiligen Reagenzien wurden durch Konzentrationsreihen (Anhang-Abbildung 1) bestimmt. Anhand der deutlichen Veränderung der Oberflächenexpression der genannten Marker in Kombination mit der Veränderung der mRNA-Level wurde die für die weiterführenden Experimente optimale Konzentration ermittelt. Lediglich die VitD₃ Stimulation der MDS-L-Zellen konnte für keine der drei getesteten Konzentrationen eine Veränderung der genannten Marker hervorrufen, weshalb die MDS-L-Zellen nicht weiterführend mit VitD₃ stimuliert wurden (siehe Anhang-Abbildung 1). Des Weiteren haben die Vortests eine wesentlich höhere Steigerung der Expression der Oberflächenmarker für THP-1-Zellen nach PMA Stimulation offenbart, wenn diese nach Stimulation für weitere 24 h ohne Stimulanz unter Standardbedingungen kultiviert wurden. Diese zusätzliche Inkubation wird im Folgenden als PMAresting (PMAr) bezeichnet.

Die Ergebnisse der ATRA- und PMA-Stimulation der MDS-L-Zellen sind in den folgenden Abbildungen illustriert.

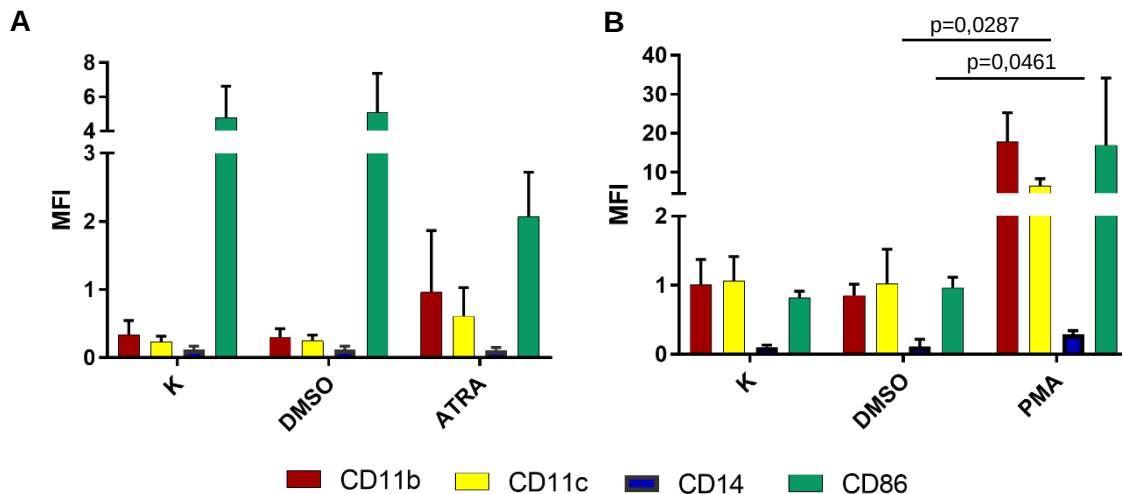


Abb. 5: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression der Marker CD11b, CD11c, CD14 und CD86 ATRA- (A) bzw. PMA-stimulierter (B) MDS-L-Zellen. Es sind die *Median Fluorescence Intensity*-Werte (MFI) der Oberflächenexpressionen nach 48-stündiger Stimulation mit 1000 nM ATRA bzw. 81 nM PMA der MDS-L-Zellen dargestellt. Sowohl unstimulierte Kontrollen (K) als auch Lösungsmittelkontrollen (DMSO) wurden mitgeführt und identisch analysiert. Die Werte der ungefärbten Proben wurden jeweils abgezogen. n=3; $\pm$ SD; dargestellt ist $p < 0,05$.

Abbildung 5A stellt eine geringe Grundexpression der Oberflächenmarker CD11b, CD11c und CD14 auf den MDS-L-Zellen dar. Dahingegen wird CD86 mit einer nahezu 15-mal stärkeren Intensität auf der Oberfläche exprimiert. Nach Inkubation mit dem bei der ATRA Stimulation verwendeten Lösungsmittel DMSO verändern sich die Oberflächenexpressionen nicht. Die Stimulation mit 1000 nM ATRA für 48 h ruft hingegen eine knapp doppelt so starke Oberflächenexpression von CD11b und CD11c, aber ein Absinken der CD86 Oberflächenexpression auf etwas weniger als die Hälfte der Grundexpression hervor. CD14 wird von allen untersuchten Oberflächenmarkern mit der geringsten Intensität exprimiert und weist keinerlei Veränderungen im Expressionsmuster unter ATRA-Einfluss auf. Dem gegenüber steht das Bild der PMA-Stimulation, wie Abbildung 5B illustriert. Auch hier werden keine Unterschiede zwischen den mit DMSO inkubierten MDS-L-Zellen und der unstimulierten Kontrolle deutlich, allerdings ist ersichtlich, dass sich die Grundexpressionen zu denen der zeitlich etwas früher durchgeführten ATRA-Stimulation, nicht signifikant aber deutlich unterscheiden. Die basale Expression der Marker CD11b und CD11c war zum Zeitpunkt der PMA-Analysen bis zu 4-mal höher, wohingegen die CD86 Expression um ein 5-faches geringer ausfiel. Die Basisexpression von CD14 weist als einziger Marker keine Veränderungen auf. Unter PMA-Stimulation steigt die MFI von CD11b um das 17-fache und für CD11c signifikant um das 6-fache und damit deutlich höher als unter ATRA-Einfluss. Gegensätzlich zur ATRA-Stimulation präsentiert sich die um ein 19-fach höhere MFI von CD86 unter PMA-Einfluss. Auch die MFI des CD14 Markers ist signifikant erhöht, auch wenn die generelle Expression auf einem sehr geringen Level bleibt.

Beide Stimulantien bewirken schließlich eine Steigerung der CD11b- und CD11c-Oberflächenexpression, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Gegensätzlich wirken die Agenzien auf den Marker CD86, dessen MFI unter ATRA-Einfluss vermindert ist, aber unter PMA-Einfluss erhöht. Auf die MFI von CD14 hat lediglich die PMA-Stimulation eine steigernde Wirkung.

Parallel zur Expressionsanalyse der untersuchten Oberflächenrezeptoren wurde auch das mRNA-Level der Rezeptoren CD11b und CD11c sowie des Transkriptionsfaktors PTTG1 der MDS-L-Zellen analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt.

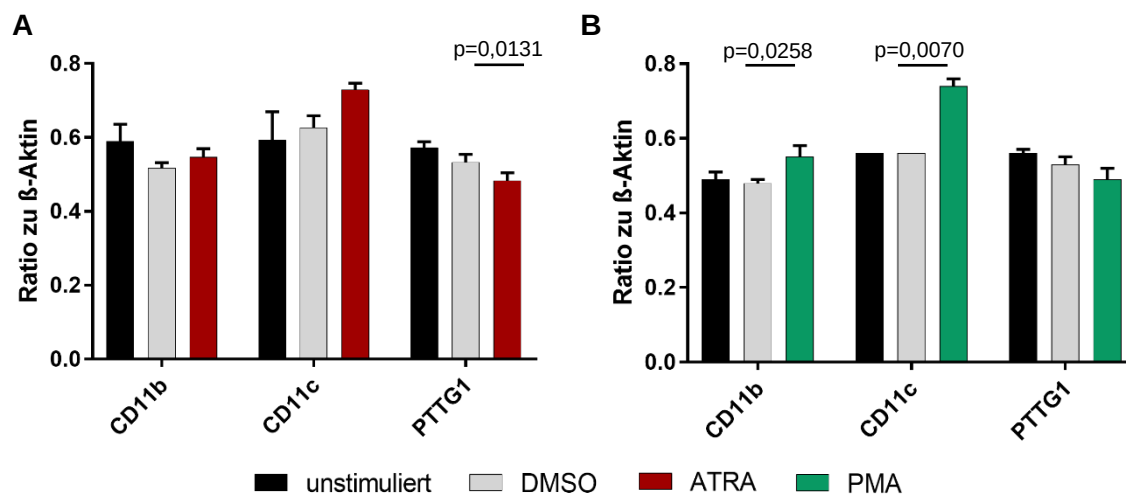


Abb. 6: RNA-Expressionsanalyse von CD11b, CD11c und PTTG1 ATRA- (A) bzw. PMA-stimulierter (B) MDS-L-Zellen. Die Graphen präsentieren die Verhältnisse der mRNA-Expression zum Housekeeper β-Aktin nach 48-stündiger ATRA- (1000 nM) bzw. PMA-Stimulation (81 nM) der Zellen. n=3; ±SD; dargestellt sind $p < 0,05$.

Die Stimulation der MDS-L-Zellen mit ATRA scheint keinen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expression der Marker CD11b und CD11c zu haben, wenn auch Tendenzen erkennbar sind (Abb. 6A). Das mRNA-Level des Transkriptionsfaktors PTTG1 ist unter ATRA-Stimulation hingegen signifikant vermindert. Unter PMA-Stimulation (Abb. 6B) sind die mRNA-Konzentrationen von CD11b und CD11c im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle signifikant erhöht, wohingegen PTTG1 nur eine Tendenz zur Verminderung aufweist.

Übereinstimmend mit den Analysen der Oberflächenexpression der Marker CD11b und CD11c aus der vorangegangenen Abbildung 6 weist auch die mRNA-Expressionsanalyse der beiden Marker eine Tendenz zur Erhöhung unter ATRA-Einfluss bzw. eine signifikante Erhöhung der Expression unter PMA-Einfluss dieser in MDS-L-Zellen auf. Ebenfalls identisch mit den vorangegangenen Ergebnissen zeigt die PMA-Stimulation einen stärkeren Einfluss als die Behandlung mit ATRA. Neben den MDS-L-Zellen wurden auch THP-1-Zellen mit den genannten Differenzierungsagenzien behandelt. Die Ergebnisse der Oberflächenexpression der analysierten Marker sind in Abbildung 7 dargestellt.

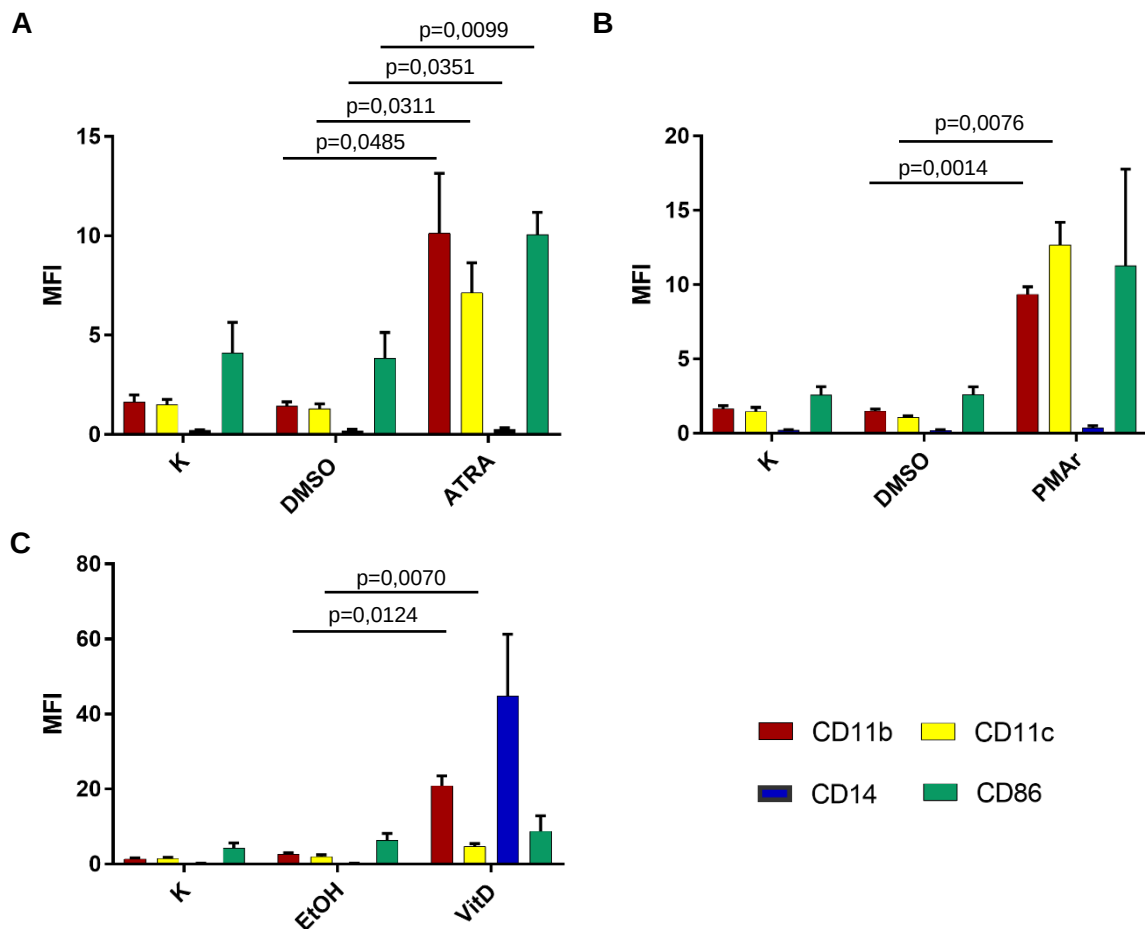


Abb. 7: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression der Marker CD11b, CD11c, CD14 und CD86 ATRA- (A), PMAr- (B) bzw. VitD₃-stimulierter (C) THP-1-Zellen. Es sind die *Median Fluorescence Intensity*-Werte (MFI) der Oberflächenexpressionen nach 48-stündiger Stimulation mit 1000 nM ATRA bzw. 500 nM VitD₃ der THP-1-Zellen dargestellt. Für die PMA-Stimulation mit 32 nM wurde das PMAr-Protokoll angewendet. Sowohl unstimulierte Kontrollen (K) als auch Lösungsmittelkontrollen (DMSO bzw. EtOH) wurden mitgeführt und identisch analysiert. Die Werte der ungefärbten Proben wurden jeweils abgezogen. n=3; $\pm$ SD; dargestellt sind $p < 0,05$.

Alle drei Experimente (Abb. 7A, B und C) spiegeln eine gleichermaßen moderate Basisexpression der Oberflächenmarker CD11b und CD11c wider. CD86 hingegen weist eine 3- bzw. 1,5-fach höhere MFI auf und damit das höchste Grundlevel der untersuchten Marker auf nativen THP-1-Zellen. Auch hier zeichnet sich ab, dass die Stärke der MFI des Markers CD86 über den Durchführungszeitraum der Experimente nicht konstant bleibt, wie die der anderen Marker. Wie schon bei den MDS-L-Zellen sinkt die MFI von CD86 bei zeitlich später durchgeführten Experimenten, hier die Stimulation mit PMAr, ab. In diesem Fall ist die MFI-Erhöhung zu CD11b bzw. CD11c nur noch 1,5-fach, wohingegen sie bei den anderen beiden Stimulationsversuchen noch doppelt so hoch war. Ebenfalls identisch zu den MDS-L-Zellen verhält es sich mit CD14, der auch auf THP-1-Zellen eine eher sehr geringe, kaum nachweisbare, Grundexpression aufweist. Die Stimulation der THP-1-Zellen mit ATRA bewirkt eine signifikante Steigerung der MFI aller untersuchten Oberflächenmarker (Abb. 7A).

Die MFI von CD11b ist um das 10-fache angestiegen, gefolgt von einer 7-fachen Steigerung bei CD11c und einer 3-fachen Steigerung bei CD86. Die schwächste Erhöhung der MFI, aber trotzdem signifikant, offenbart CD14 mit einer lediglich 1,2-fachen Steigerung im Vergleich zur DMSO-Probe. Die Behandlung mit DMSO hat hingegen keine signifikanten Auswirkungen auf die Oberflächenexpression der THP-1-Zellen, was sowohl für die Experimente der ATRA-, als auch die PMAr-Experimente (Abb. 7B) zutrifft. Auch unter PMA-Einfluss wird die MFI von CD11b um das 6-fache und bei CD11c um das 12-fache signifikant gesteigert. CD86 deutet ebenfalls eine Tendenz zu einer Erhöhung der MFI an, wohingegen CD14 eine völlig unverändert niedrige MFI aufweist. Die Stimulation der THP-1-Zellen mit VitD₃ bewirkt ebenfalls eine signifikante Erhöhung der MFI von CD11b um das 10-fache und bei CD11c um das 2,3-fache im Vergleich zur Ethanol-Probe (Abb. 7C). Auch CD86 präsentiert in diesem Setup eine tendenziell höhere MFI, allerdings unbeeindruckt von der Anwesenheit von VitD₃. Dem gegenüber steht CD14, dessen MFI unter VitD₃-Einfluss stark, wenn auch nicht signifikant, ansteigt.

Die THP-1-Zellen reagieren auf die Stimulation aller drei getesteten Agenzien mit einer signifikanten Erhöhung der MFI der Marker CD11b und CD11c, identisch mit den MDS-L-Zellen in unterschiedlichem Maß. CD86 zeigt ebenfalls unter allen Behandlungen eine tendenziell erhöhte MFI. Kaum sichtbar, aber signifikant ist die MFI-Erhöhung von CD14 unter ATRA-Stimulation. Gleichzeitig ist dies auch der Marker mit der geringsten basalen MFI.

Die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse der THP-1-Zellen sind in Abbildung 8 dargestellt.

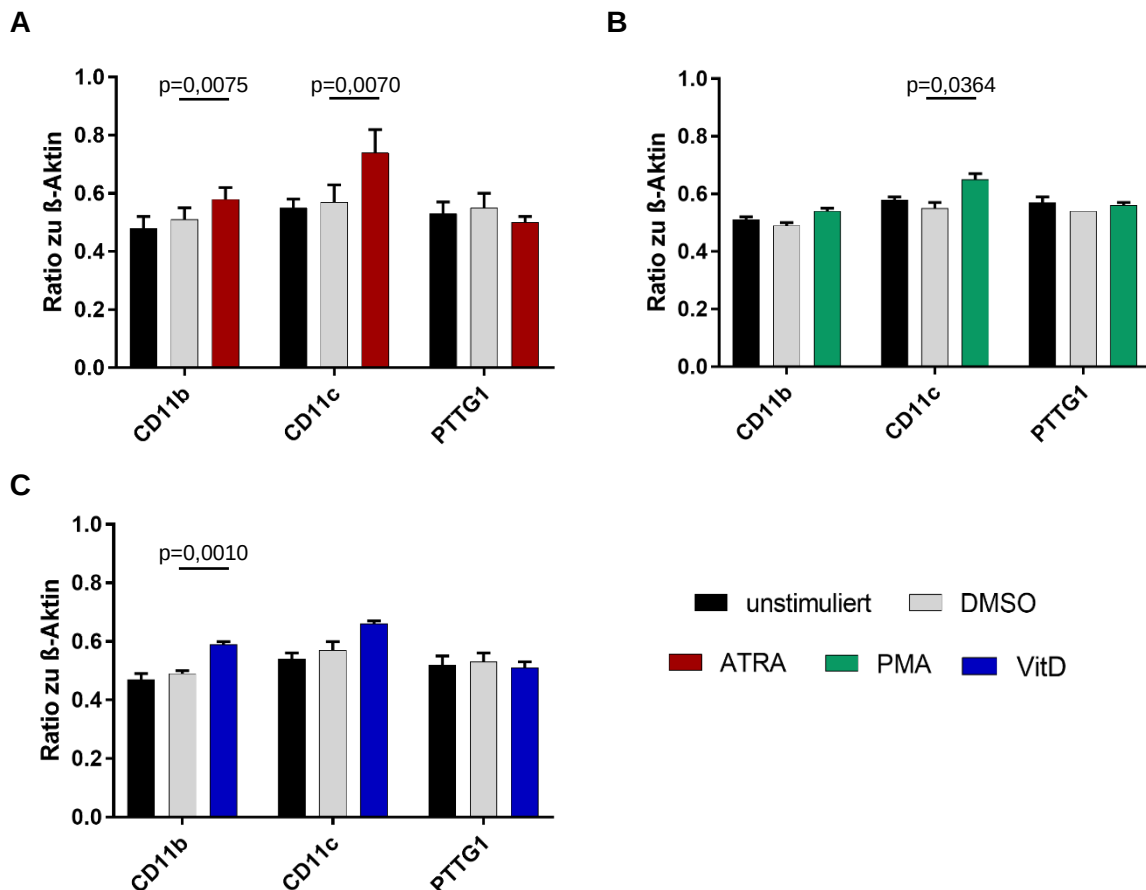


Abb. 8: RNA-Expressionsanalyse von CD11b, CD11c und PTTG1 ATRA- (A), PMAr- (B) und VitD₃-stimulierter (C) THP-1-Zellen. Die Graphen präsentieren die Verhältnisse der mRNA-Expression zum Housekeeper β -Aktin nach 48-stündiger ATRA- (1000 nM) bzw. VitD₃-Stimulation (500 nM) der Zellen. Für die PMA-Stimulation mit 32 nM wurde das PMAr-Protokoll angewendet. n=3; $\pm$ SD; dargestellt ist $p < 0,05$.

Die mRNA-Expressionsanalyse ATRA-stimulierter THP-1-Zellen spiegelt das Bild der Oberflächenexpression (Abb. 8A) wider. So bestätigen sich auch auf mRNA-Level signifikant erhöhte CD11b- und CD11c-Werte. Der Transkriptionsfaktor PTTG1 offenbart keine signifikante Veränderung, wie auch unter PMAr- (Abb. 8B) und VitD₃-Einfluss (Abb. 8C). Nach PMAr-Stimulation ist eine signifikant erhöhte CD11c-mRNA nachweisbar, wohingegen nach VitD₃-Stimulation eine signifikant erhöhte CD11b-mRNA nachweisbar ist. Hier ist beim CD11c-mRNA-Level lediglich eine Tendenz zur Erhöhung erkennbar.

Übereinstimmend mit den durchflusszytometrischen Analysen (Abb. 7) hat die Stimulation mit ATRA den größten Einfluss auf das mRNA-Level der Marker CD11b und CD11c, wobei beide genannten auch unter PMAr und VitD₃-Stimulation eine signifikante Erhöhung bzw. den Trend zur Erhöhung aufweisen. Ungeachtet aller drei verwendeten Differenzierungsagenzien verhält sich das mRNA-Level des Transkriptionsfaktors PTTG1 in THP-1-Zellen unbeeinflusst.

4.1.3 Der Einfluss von mikroRNA-Überexpression auf das Differenzierungsverhalten von THP-1 und MDS-L

Für die Analyse des Einflusses ausgewählter mikroRNA-Kandidaten auf das Differenzierungsverhalten der leukämischen Zelllinien MDS-L und THP-1 wurden diese zunächst wie unter 3.1.2 ausgeführt transient transfiziert und anschließend mit denen unter 4.1.1 bereits aufgeführten Differenzierungsagenzien wie beschrieben stimuliert. Die Ergebnisse für miR-transfizierte und anschließend ATRA- bzw. PMA-stimulierte MDS-L-Zellen sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

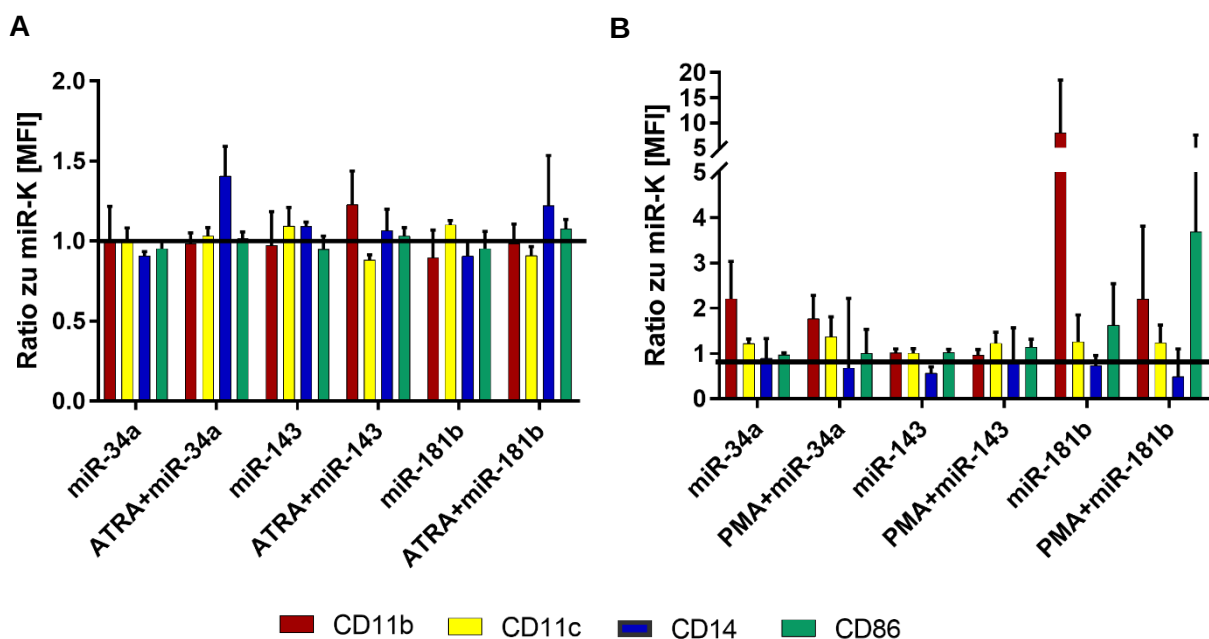


Abb. 9: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression der Marker CD11b, CD11c, CD14 und CD86 transfizierter und anschließend ATRA- (A) bzw. PMA-stimulierter (B) MDS-L-Zellen. Es sind die *Median Fluorescence Intensity*-Werte (MFI) der Oberflächenexpressionen nach 48-stündiger Transfektion und anschließender 48-stündiger Stimulation mit 1000 nM ATRA bzw. 32 nM PMA dargestellt. Die Werte der ungefärbten Proben wurden jeweils abgezogen und anschließend wurden die MFI-Werte der miR-transfizierten Proben ins Verhältnis zur Kontroll-transfizierten Probe (miR-K) gesetzt und dargestellt. n=3; $\pm$ SD.

Sowohl nur miR-transfizierte als auch anschließend mit ATRA stimulierte MDS-L-Zellen zeigen keine signifikanten Veränderungen in ihrem CD11b-, CD11c-, CD14- oder CD86-Oberflächenexpressionsprofil im Vergleich zur miR-kontroll-transfizierten Probe (Abb. 9A). Es wird auch deutlich, dass die MFI von CD11b und CD14 die größten Schwankungen innerhalb des Experiments aufweisen, wohingegen die MFI von CD86 die konstantesten Werte präsentiert. CD11c scheint nach Transfektion von miR-143 und miR-181b mit anschließender ATRA-Stimulation eine tendenziell erniedrigte MFI aufzuweisen, genau wie CD14 nach Überexpression von miR-34a ohne die anschließende Stimulation mit ATRA. Unter miR-34-Überexpression und ATRA-Stimulation scheint die MFI von CD14 hingegen leicht anzusteigen.

Unter PMA-Stimulation (Abb. 9B) gibt es gleichermaßen keine signifikanten Veränderungen der Oberflächenexpressionen. Auch hier unterliegt die MFI von CD11b den größten Schwankungen, am deutlichsten nach Transfektion von miR-181b obgleich mit oder ohne PMA-Stimulation. Diese Schwankungen der MFI treten allerdings hier nicht den gleichen Proben wie in der ATRA-Stimulation auf. Auch CD86 weist hier eine Tendenz zur Erhöhung nach Transfektion von miR-181b auf, gegensätzlich zu Abbildung 10A.

Es konnten keine signifikanten Veränderungen der Oberflächenexpression der Marker CD11b, CD11c, CD14 und CD86 verzeichnet werden, wenn auch Tendenzen in miR-transfizierten und miR-transfiziert-stimulierten Proben deutlich werden. Die Tendenzen der miR-transfizierten-nicht stimulierten Proben präsentieren in den beiden Graphen der ATRA- und PMA-Stimulation (Abb. 9A und B) allerdings kein deckendes Bild. Die Analyse der mRNA-Level von CD11b, CD11c und dem Transkriptionsfaktor PTTG1 ist in Abbildung 10 dargestellt.

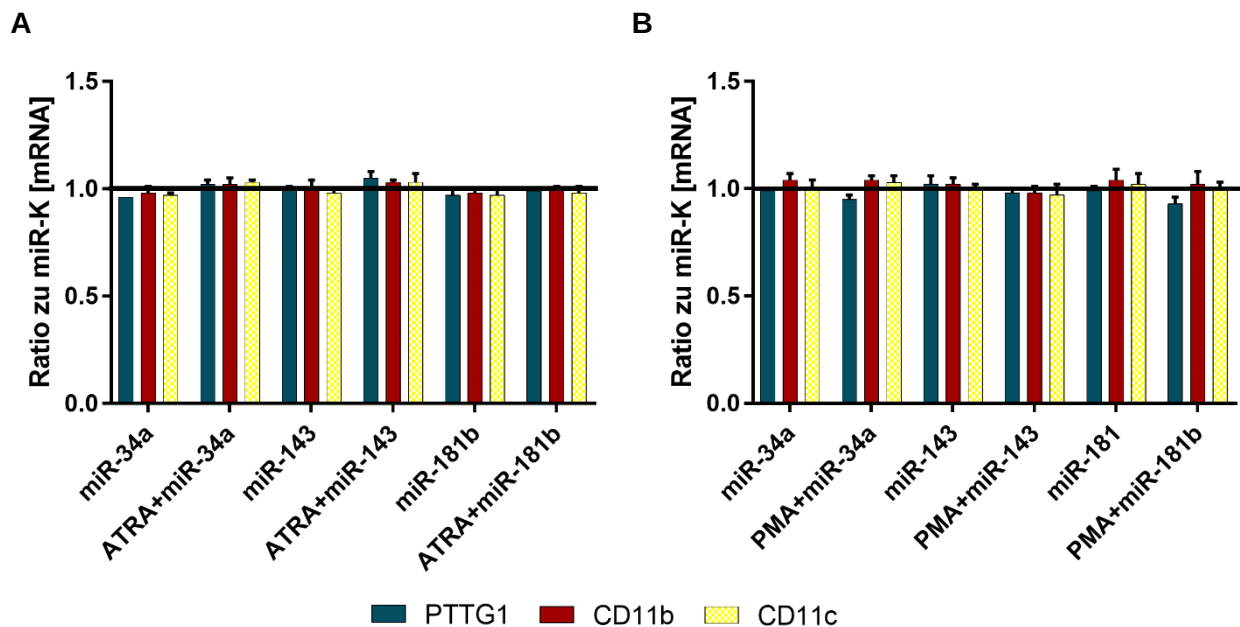


Abb. 10: RNA-Expressionsanalyse der Marker CD11b und CD11c, sowie des Transkriptionsfaktors PTTG1 transfizierter und mit ATRA- (A) bzw. PMA-stimulierter (B) MDS-L-Zellen. Es sind Verhältnisse der Ct-Werte der miR-transfizierten Proben zur Kontroll-transfizierten Probe (miR-K) dargestellt. Die Ct-Werte aller Proben wurden zunächst gegen den *Housekeeper* β -Aktin ins Verhältnis gesetzt und diese dann wiederum gegen die jeweilige miR-K. $n=3$; $\pm$ SD.

Nach Transfektion von miR-34, miR-143 und miR-181b mit und ohne anschließender Stimulation von ATRA (Abb. 10A) bzw. PMA (Abb. 10B) verdeutlichen die Abbildungen übereinstimmend keine signifikanten Veränderungen in der mRNA-Expression von CD11b und CD11c im Vergleich zur miR-kontroll-transfizierten Probe. Ebenso bleibt das Expressionslevel von PTTG1 unbeeinflusst von miR-Transfektion und ATRA- bzw. PMA-Stimulation.

Identische Experimente wurden mit den THP-1-Zellen durchgeführt, deren Ergebnisse in den folgenden Abbildungen dargestellt sind.

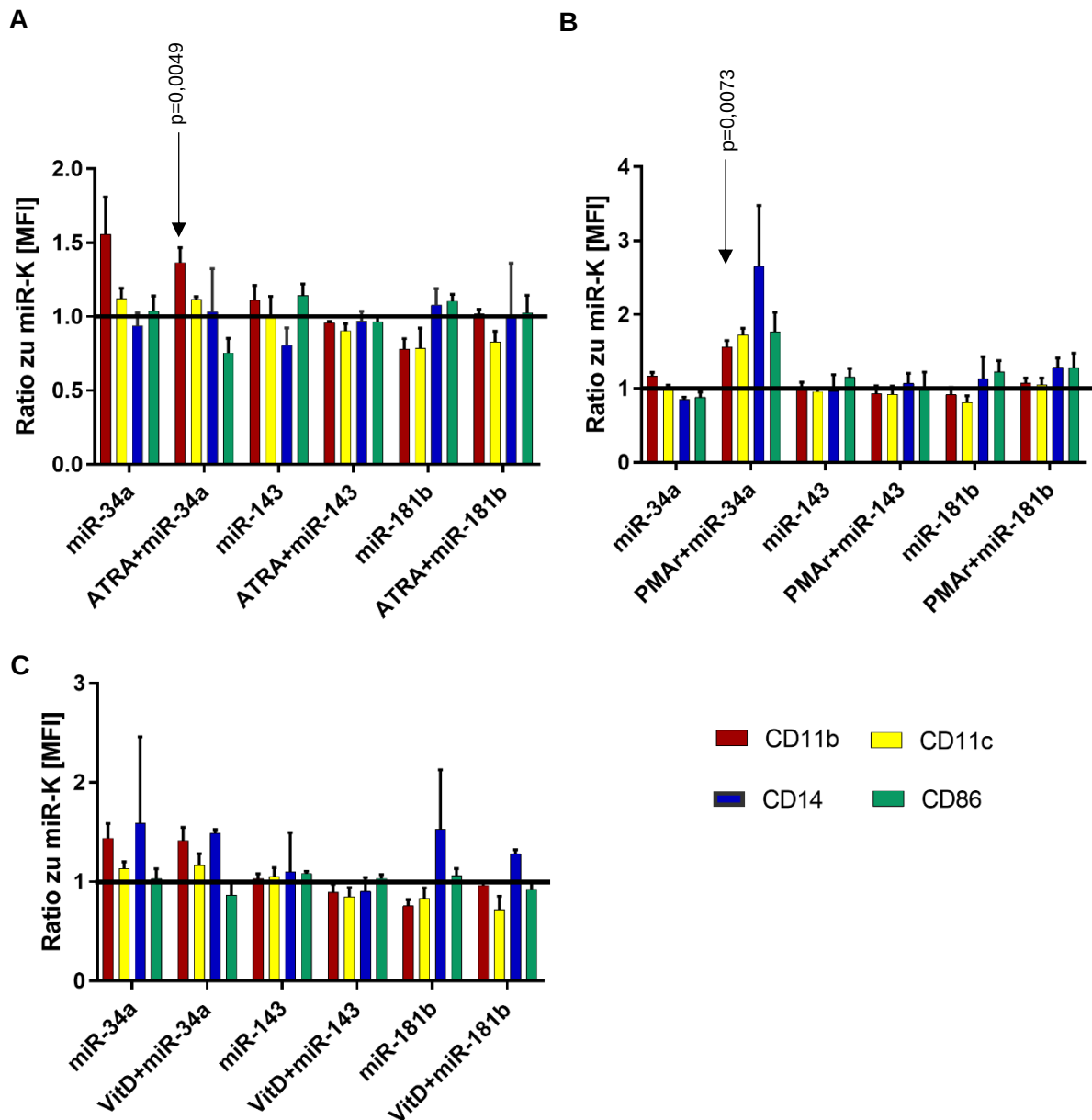


Abb. 11: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression der Marker CD11b, CD11c, CD14 und CD86 transfizierter und anschließend ATRA- (A), PMA- (B) bzw. VitD₃-stimulierter (C) THP-1-Zellen. Es sind die *Median Fluorescence Intensity*-Werte (MFI) der Oberflächenexpressionen nach 48-stündiger Transfektion und anschließender 48-stündiger Stimulation mit 1000 nM ATRA bzw. 500 nM VitD₃ dargestellt. Für die PMA-Stimulation wurde das PMA-Protokoll verwendet. Die Werte der ungefärbten Proben wurden jeweils abgezogen und anschließend wurden die MFI-Werte der miR-transfizierten Proben ins Verhältnis zur Kontroll-transfizierten Probe (miR-K) gesetzt und dargestellt. n=3; ±SD; dargestellt ist p<0,01.

Die Transfektion von miR-34a, miR-143 und miR-181b hat keinen signifikanten Einfluss auf die Expression aller untersuchten Oberflächenmarker. Nach miR-34a-Überexpression und anschließender ATRA-Stimulation steigt die MFI des Markers CD11b jedoch signifikant an.

Eine scheinbare Erniedrigung des genannten Markers bewirkt die Überexpression von miR-181b, die unter ATRA-Einfluss nicht mehr dokumentierbar ist. Hier wird dann wiederum eine Erniedrigung der MFI von CD11c deutlich, die so in keiner anderen Probe vorkommt. Die Stimulation mit PMAr (Abb. 11B) in Kombination mit einer miR-181b-Überexpression verdeutlicht diese Erniedrigung ebenfalls nicht, aber dafür eine leichte Erhöhung der MFI von CD14 und CD86. Unter Überexpression von miR-34a dagegen deutet sich eine erniedrigte MFI von CD14 an, die unter Stimulation mit PMAr nicht mehr vorhanden ist, sondern eher in eine tendenziell erhöhte MFI übergeht. Die MFI von CD11b und CD11c hingegen sind unter miR-34-Überexpression und PMAr-Stimulation signifikant bzw. tendenziell erhöht. Auch in diesem Setup ist keine Beeinflussung der Oberflächenexpression durch miR-143-Überexpression (mit und ohne PMAr-Stimulation) erkennbar, was sich im VitD₃-Stimulationsversuch ebenfalls (Abb. 11C) wiederholt. Identisch mit den beiden vorangegangenen Graphen auch hier nach Überexpression von miR-34a mit anschließender Stimulation, in diesem Fall mit VitD₃, eine tendenzielle Erhöhung der MFI von CD11b darstellbar. Diese ist in Abbildung 11C auch unter nicht stimulierten Bedingungen erkennbar. Ebenfalls unter dem Einfluss von miR-34a-Überexpression und VitD₃-Stimulation ist ein Trend zur Erhöhung der MFI von CD14 erkennbar.

Die Überexpression von miR-34a in THP-1-Zellen führt zu einer tendenziellen bzw. zu einer signifikanten Erhöhung der MFI von CD11b (Abb. 11A und B), die auch nach Behandlung mit den aufgeführten Stimulantien erhalten blieb.

Die anschließende mRNA-Analyse der Oberflächenmarker CD11b und CD11c bzw. des Transkriptionsfaktors PTTG1 in den transfizierten und transfiziert-stimulierten THP-1-Zellen ist in Abbildung 12 dargestellt.

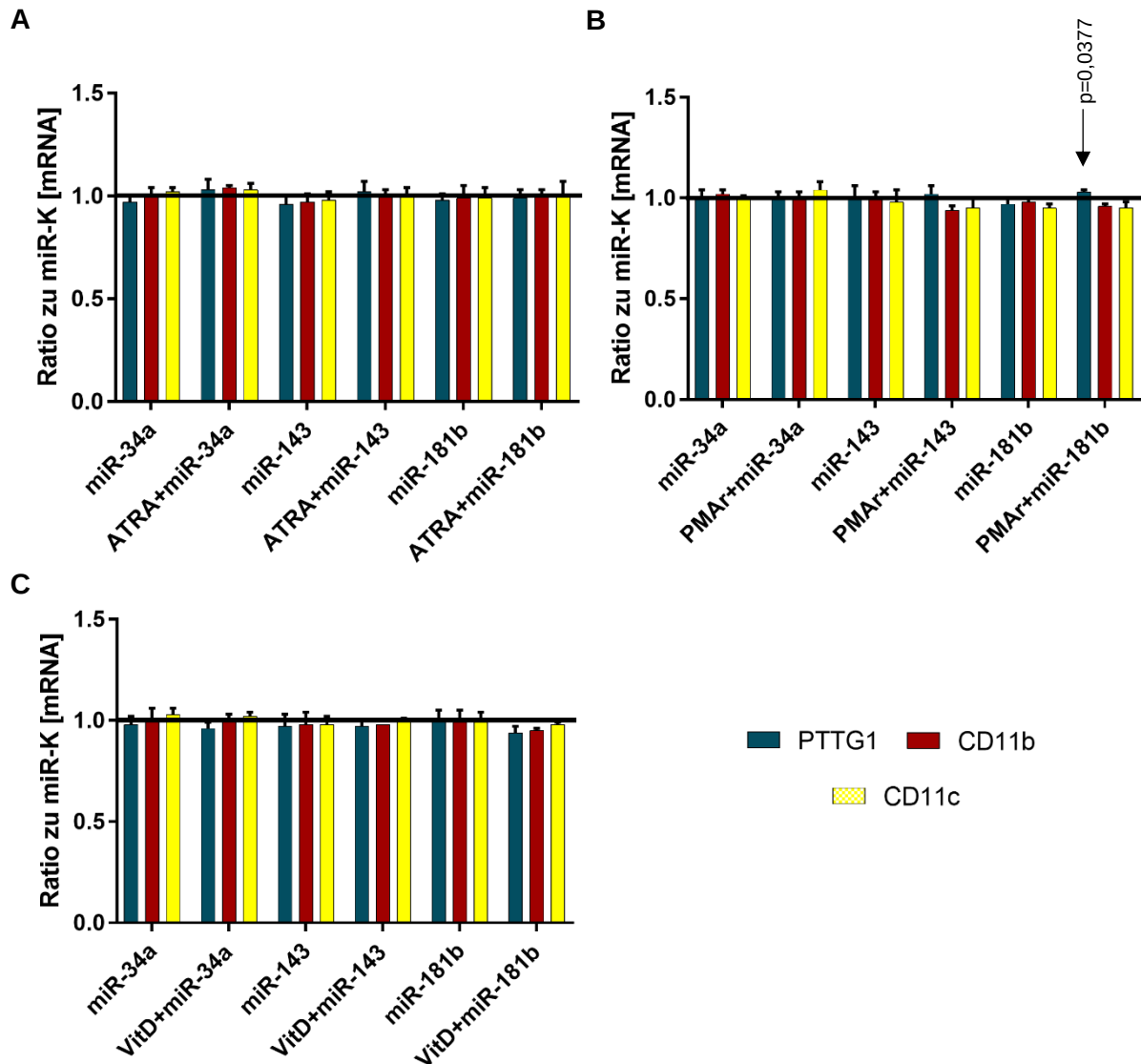


Abb. 12: RNA-Expressionsanalyse der Marker CD11b und CD11c, sowie des Transkriptionsfaktors PTTG1 transfizierter und mit ATRA- (A), PMAr- (B) und VitD₃-stimulierter (C) THP-1-Zellen. Es sind Verhältnisse der Ct-Werte der miR-transfizierten Proben zur Kontroll-transfizierten Probe (miR-K) dargestellt. Die Ct-Werte aller Proben wurden zunächst gegen den *Housekeeper* β -Aktin ins Verhältnis gesetzt und diese dann wiederum gegen die jeweilige miR-K. n=3; $\pm$ SD; dargestellt ist $p < 0,05$.

Die dargestellten Ratios der transfizierten zur miR-kontroll-transfizierten Probe lassen unter ATRA-Einfluss, als auch im unstimulierten Zustand (Abb. 12A) keine signifikanten Veränderungen der Expressionsmuster in THP-1-Zellen erkennen. Dieses Bild ist nahezu identisch mit dem der PMAr-Stimulation (Abb. 12B), bei der auch keine signifikanten Veränderungen der Expressionslevel der Marker CD11b und CD11c zu verzeichnen sind. Einzig die Expression von PTTG1 ist unter miR-181b-Überexpression in Verbindung mit der PMAr-Stimulation signifikant erhöht im Vergleich zur miR-Kontrolle. Unter VitD₃-Stimulation (Abb. 12C) sind ebenfalls keine signifikanten Veränderungen darstellbar.

4.1.4 Das Proliferationsverhalten von THP-1 und MDS-L nach mikroRNA-Überexpression

Das Proliferationsverhalten der Zellen nach Transfektion der mikroRNA-Kandidaten wurde mittels des *Click-iT™ EdU* Zellproliferationskit untersucht. Die proliferierenden, also DNA synthetisierenden, Zellen werden dabei mit einem Farbstoff markiert, sodass der prozentuale Anteil dieser Zellen anschließend durchflusszytometrisch bestimmt werden kann (Abb. 13).

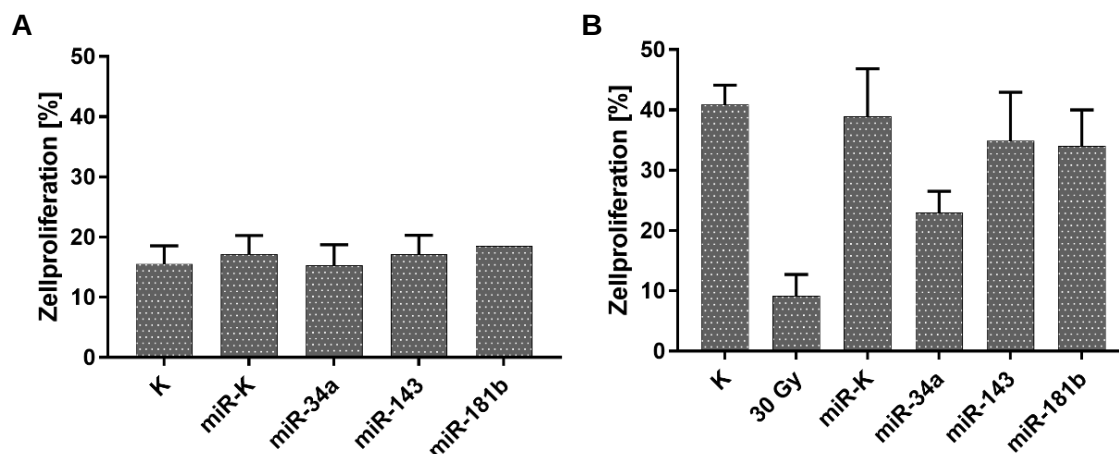


Abb. 13: Anteil proliferierender MDS-L- (A) bzw. THP-1- (B) Zellen nach 48-stündiger Transfektion mit miR-34a, miR-143 bzw. miR-181b. Für die MDS-L- und THP-1-Zellen wurden mikroRNA-*mimic* transfizierte Proben und die Kontrollprobe (K) analysiert (n=5). Eine mit 30 Gy bestrahlte THP-1-Probe diente als Kontrolle für die Blockade der Zellproliferation (n=2); $\pm$ SD.

MDS-L-Zellen offenbaren eine geringe Grundproliferation (Abb. 13A) mit einem Anteil von ca. $16 \pm 3,0$ % an proliferierenden Zellen. Dieser Wert verändert sich auch nach transienter Transfektion von miR-34a, miR-143 oder miR-181b nicht signifikant. Wohingegen die THP-1-Zellen mit $41 \pm 3,2$ % eine mehr als doppelt so stark ausgeprägte Proliferation in der Kontrollgruppe aufweisen (Abb. 13B). Auch hier übt die Überexpression von miR-143 und miR-181b keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen aus. Die zur Hemmung der Proliferation mit 30 Gy bestrahlte Kontrollprobe weist nur noch $9 \pm 3,6$ % proliferierende Zellen auf. Die Überexpression von miR-34a in THP-1-Zellen bewirkt ein Absinken des Anteils proliferierender Zellen auf $23 \pm 3,6$ %. Parallel zur durchflusszytometrischen Analyse wurde das mRNA Level der Proliferationsmarker c-MYC und CDK4 sowie des an der Proliferation beteiligten Transkriptionsfaktors E2F3 ermittelt (Abb. 14) [112–114].

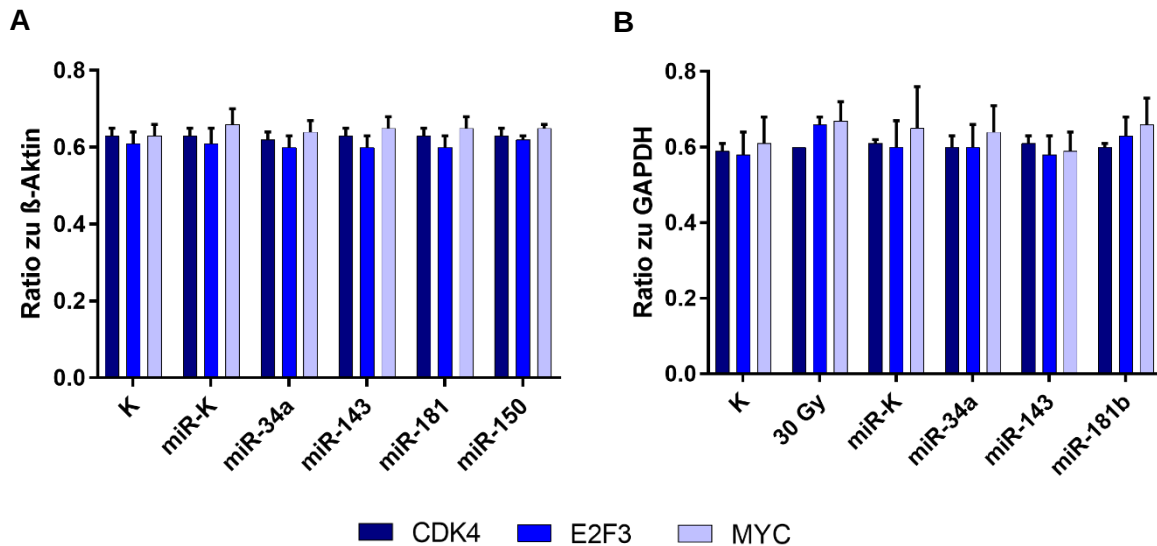


Abb. 14: mRNA-Level von CDK4, E2F3 und c-MYC in MDS-L-(A) und THP-1-(B) Zellen nach 48-stündiger mikroRNA-mimic Transfektion. Es sind die relativen mRNA-Level in Relation zum Housekeeper β -Aktin für MDS-L und GAPDH für THP-1 dargestellt. $n=3$; $\pm$ SD.

Die Abbildung illustriert, dass CDK4, E2F3 und c-MYC auf identischen Levels in beiden Zelllinien im Verhältnis zum Housekeeper β -Aktin bzw. GAPDH exprimiert werden. Die Transfektion von miR-34a, miR-143 und miR-181b hat keinen signifikanten Einfluss auf das Expressionslevel der untersuchten Marker in MDS-L-Zellen (Abb. 14A). Ebenso verhält es sich mit den THP-1-Zellen (Abb. 14B). Auch hier lassen sich keine signifikanten Veränderungen der Expressionsmuster sowohl in bestrahlten als auch mit miR-mimic transfizierten THP-1-Zellen darstellen.

4.1.5 Beeinflussung des Zellzyklus der THP-1- und MDS-L-Zellen nach mikroRNA-Überexpression

Die einzelnen Phasen des Zellzyklus werden durch einen unterschiedlich hohen DNA-Gehalt der Zellen gekennzeichnet. Der Farbstoff Propidiumiodid (PI) interkaliert mit der DNA der zuvor fixierten Zellen und die Proben können anschließend durchflusszytometrisch analysiert werden. Dabei ergibt sich ein typisches Bild, bei dem der prozentuale Anteil an Zellen in den Zellzyklusphasen sub-G1, G1, S und G2-M ermittelt werden kann [115]. Ein solches Bild ist repräsentativ in Abbildung 15 dargestellt.

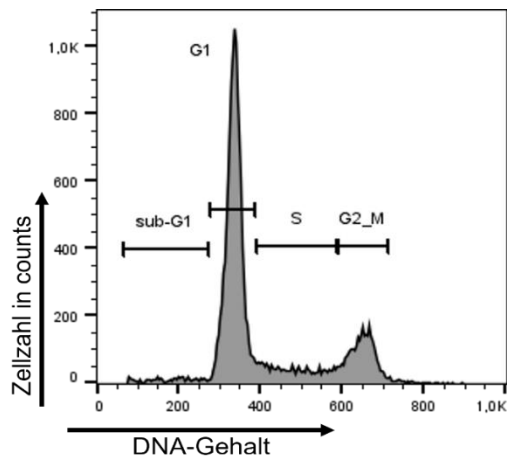


Abb. 15: Repräsentative Darstellung einer Propidiumiodid-gefärbten Zellkulturprobe für die durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus. Der DNA-Gehalt (x-Achse) kennzeichnet die einzelnen Zellzyklusphasen, deren prozentualer Zellgehalt anschließend ermittelt werden kann.

Die so ermittelten prozentualen Anteile der mit PMA stimulierten bzw. miR-*mimic* transfizierten Proben der THP-1- und MDS-L-Zellen werden in den folgenden Abbildungen graphisch dargestellt. Parallel dazu erfolgte eine RNA-Analyse der Proben hinsichtlich ihrer Expression der p50- und p65-Untereinheiten des Transkriptionsfaktors NFκB, welcher eine substantielle Rolle für die Regulation des Zellzyklus spielt [116].

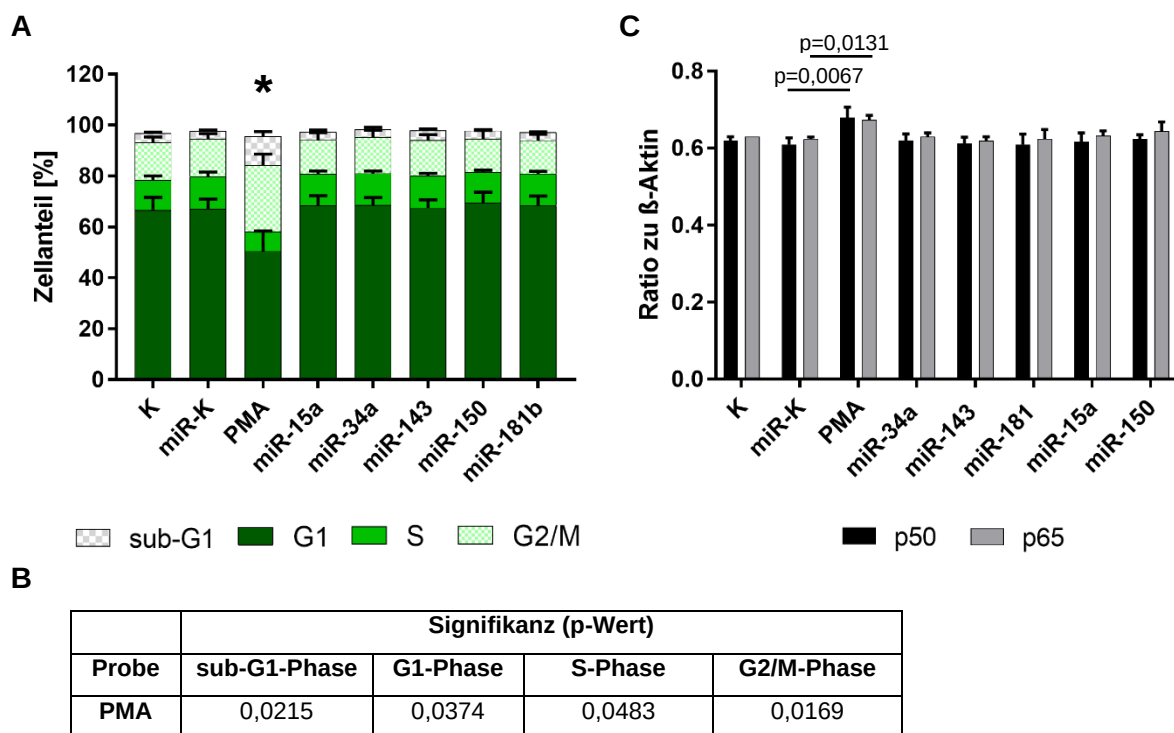


Abb. 16: Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse (A, B) und mRNA-Expressionsuntersuchung (C) transfizierter MDS-L-Zellen. Es sind die prozentualen Anteile der sub-G1-, G1-, S- und G2/M-Phase transfizierter MDS-L-Zellen dargestellt, wobei die mit * markierten signifikanten Ergebnisse auf die miR-kontroll-transfizierte Probe bezogen sind (B). Die mRNA-Expressionslevel sind im Verhältnis zum *Housekeeper* β-Aktin angegeben (C). n=3; ±SD; dargestellt ist p<0,05 bzw. mit * markiert und separat tabellarisch aufgeführt.

Die Überexpression der mikroRNAs miR-15a, miR-34a, miR-143, miR-150 und miR-181b hat keinen signifikanten Einfluss auf den Zellzyklus der MDS-L-Zellen (Abb. 16A). Die Anteile der Zellen in der sub-G1-Phase liegen bei allen transfizierten Proben auf dem identischen Level der Kontrollproben K und miR-K bei ca. 4 %. Gleiches Bild ergibt sich auch für den Anteil an Zellen in der G1-Phase mit ca. 67 %, der S-Phase mit ca. 13 % und der G2/M-Phase mit ca. 16 %. Einzig die mit PMA stimulierte Probe weist eine signifikante Verschiebung der Anteile aller Zellzyklusphasen auf. Hier stellt sich eine signifikante Verminderung der prozentualen Zellzahl in der G1-Phase auf ca. 50 % dar. Gleichzeitig ist der Anteil der Zellen in der S-Phase ebenfalls auf ca. 8 % vermindert. Dies geschieht zugunsten der G2/M- bzw. der sub-G1-Phase, in denen jeweils eine Zunahme der Zellanteile um ca. 14 bzw. 8 % zu verzeichnen ist. Auch die mRNA-Analyse der transfizierten Proben in Abbildung 16C zeigt keine signifikanten Veränderungen im Expressionsmuster der NFκB-Untereinheiten p50 und p65. Identisch mit den durchflusszytometrischen Analysen weist hingegen die mit 48 nM PMA-stimulierte Probe wiederum signifikante Erhöhungen der p50- und p65-Expressionslevel auf. Die Zellzyklusanalyse der THP-1-Zellen vermittelt ein weitaus diverseres Bild.

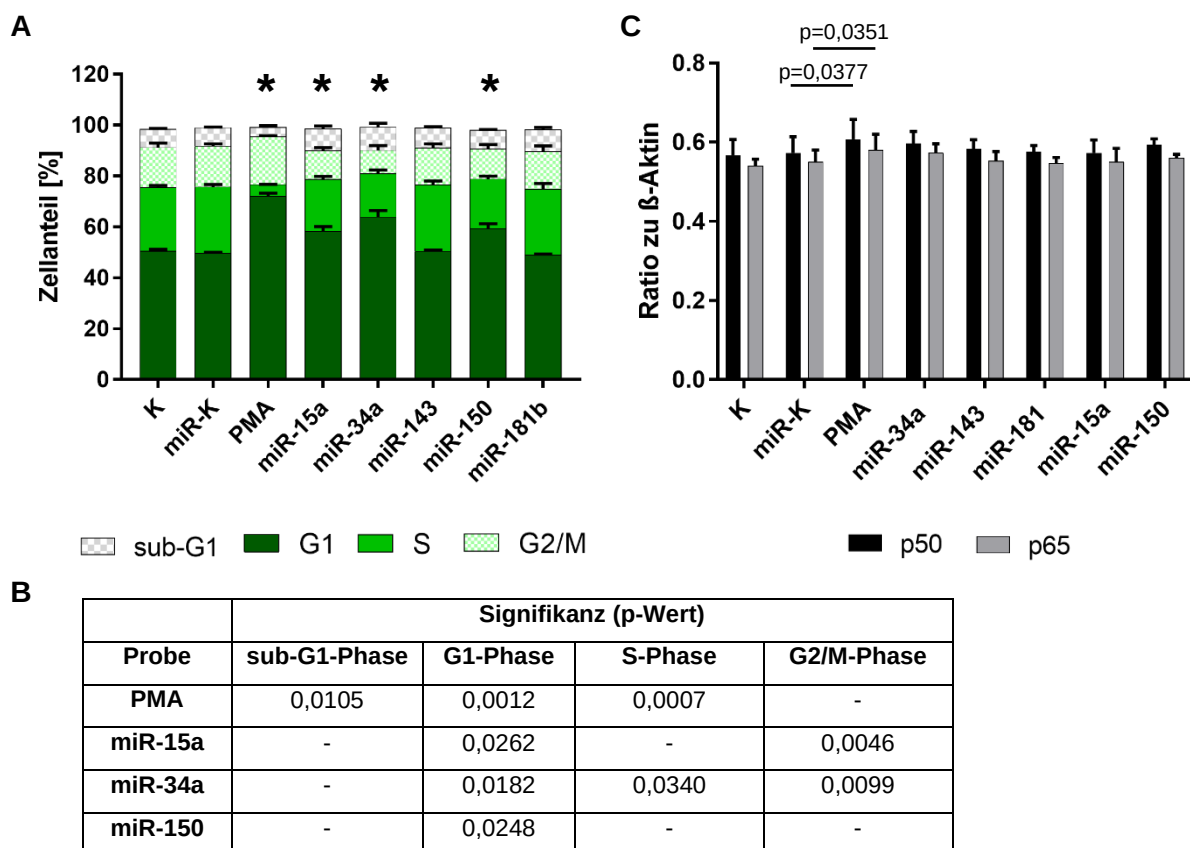


Abb. 17: Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse (A, B) und mRNA-Expressionsuntersuchung (C) transfizierter THP-1-Zellen. Es sind die prozentualen Anteile der sub-G1-, G1-, S- und G2/M-Phase transfizierter THP-1-Zellen dargestellt, wobei die mit * markierten signifikanten Ergebnisse auf die miR-kontroll-transfizierte Probe bezogen sind (B). Die mRNA-Expressionslevel sind im Verhältnis zum *Housekeeper* β-Aktin angegeben (C). n=3; ±SD; dargestellt ist p<0,05 bzw. mit * markiert und separat tabellarisch aufgeführt.

Die Überexpression der miR-143 und miR-181b hat keinen signifikanten Einfluss auf den Zellzyklus der THP-1-Zellen. Deren Zellanteile liegen auf einem identischen Level wie die der Kontrolle bzw. miR-Kontrolle in subG1 bei ca. 8 %, in G1 bei ca. 50 %, in der S-Phase bei ca. 26 % und in der G2/M-Phase bei ca. 16 % (Abb. 17A). In der PMA-stimulierten Probe hingegen ist der Anteil an Zellen in der G1-Phase auf ca. 72 % angestiegen, aber in der S-Phase auf knapp 5 % und in der sub-G1-Phase auf ca. 4 % abgesunken. Einzig die G2/M-Phase weist keine signifikanten Veränderungen auf (Abb. 17B). Die Überexpression von miR-15a, miR-34a und miR-181b bewirkt jeweils einen signifikanten Anstieg des prozentualen Zellanteils in der G1-Phase auf ca. 58, 64 bzw. 60 %. Parallel dazu nimmt der Anteil der Zellen in der S-Phase tendenziell bei der Überexpression von miR-15a und miR-150 (jeweils 20 %) bzw. signifikant bei der Überexpression von miR-34a (ca. 17 %) ab. Letztere mikroRNA bewirkt ebenfalls eine signifikante Erniedrigung der prozentualen Zellanteile in der G2/M-Phase auf 9 %. Auch die Überexpression von miR-15a hat diese Wirkung und senkt den Zellanteil in dieser Phase auf knapp 11 %. Die mRNA-Analyse (Abb. 17C) weist keine signifikanten Veränderungen der Expressionslevel von p50 und p65 in allen transfizierten Proben auf. Identisch zu den MDS-L-Zellen bewirkt auch hier lediglich die PMA-Stimulation mit 48 nM signifikant erhöhte p50- und p65-Expressionslevel.

Sowohl die Überexpression von miR-34a, als auch die von miR-15a und miR-150 in THP-1-Zellen bewirken eine Veränderung der Zellanteile in den einzelnen Phasen des Zellzyklus. Dabei findet eine Verschiebung der prozentualen Anteile zugunsten der G1-Phase statt, wohingegen die Anzahl der Zellen in der S- bzw. G2-Phase tendenziell bzw. signifikant abnimmt.

4.2. Identifizierung von differentiell exprimierten mikroRNAs in isolierten T-Zellen aus humanen Knochenmarkproben von MDS-Patient*innen und nicht-MDS-Proband*innen

4.2.1 Die Zellsortierung von Knochenmarksproben

Für eine differentielle Analyse einzelner Subpopulationen in den Knochenmarkproben der MDS-Patient*innen und der nicht-MDS-Proband*innen wurde ein Panel entwickelt, welches die durchflusszytometrische Differenzierung von Subpopulationen mit anschließender Sortierung dieser zulässt. Neben dem spezifischen Leukozytenmarker CD45 wurden auch die T-Zellmarker CD3, CD4 und CD8 eingesetzt. Darüber hinaus wurden die Stammzell- bzw. Zellvorläufermarker CD34 und CD117 benutzt [117]. Für die Sortierung der gewünschten Populationen wurde der *BD FACS Aria II Flow Cytometry Cell Sorter* der *Core Facility* Durchflusszytometrie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genutzt. Die angewendete *gating*-Strategie, um die erstrebten Populationen zu erhalten, ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

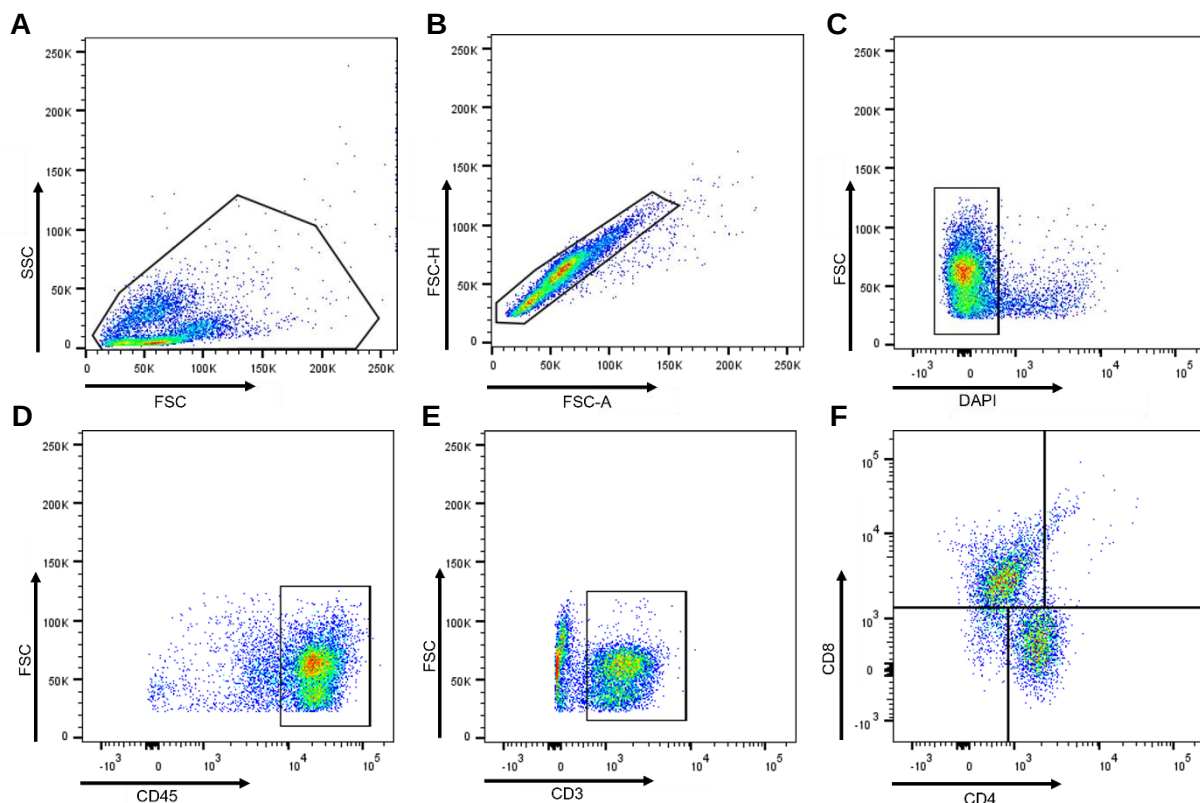


Abb. 18: Angewendete *gating*-Strategie zur durchflusszytometrischen Sortierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus Knochenmarksproben verschiedenen Ursprungs. Jedes dargestellte *gate* bezieht sich auf das vorangegangene, wobei (A) die Grundpopulation der Probe darstellt. Daraus werden dann wiederum die Dubletten (B) und toten Zellen (C) exkludiert. Von den noch lebenden Zellen werden dann die CD45⁺ Zellen ermittelt (D), aus denen die CD3⁺ Zellen (E) herausgefiltert werden. Diese trennt man anschließend in die beiden Subpopulationen CD4⁺ und CD8⁺ (F).

Die in der Abbildung 18 dargestellte *sorting*-Strategie steht repräsentativ für alle analysierten Knochenmarksproben. Aus allen Events der Probe (Abb. 18A) wurden zunächst die Dubletten, also aggregierte Zellen, und toten Zellen (Abb. 18B und C), mittels DAPI-Färbung, ausgeschlossen, bevor auf die CD45⁺ Lymphozyten *gated* wurde (D). Aus diesen wurden anschließend alle T-Zellen mittels Anti-CD3-Färbung ermittelt und als Mutterpopulation (E) für die anschließende Separierung in die Subtypen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen *gated*. Auf diese Weise konnten insgesamt 21 Knochenmarksproben analysiert werden. Davon waren 10 MDS-Knochenmark-, 5 kommerziell erworbene nicht-MDS-Knochenmark- und 6 Knochenmarksproben von Körperspendern (auch nicht-MDS-Knochenmark) aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Die Qualität und verfügbare Quantität der untersuchten Proben hat sehr stark variiert. So wiesen die kommerziell erworbenen Proben (NM 11-15) die beste Vitalität mit $95,6 \pm 2,4$ % auf, gefolgt von den MDS-Proben (1-10) mit $87,3 \pm 9,9$ % und an letzter Stelle die Körperspenderproben (KS 16-21) mit $63,3 \pm 14,9$ %. Das verfügbare Material war bei den Körperspendern der größte Anteil, wohingegen die kommerziell erworbenen MDS- und nicht-MDS-Proben sich auf max. 2 Kryokonservierungsröhrchen zu je max. 1×10^6 Zellen begrenzten.

Die zellulären Zusammensetzungen dieser Knochenmarksproben in Bezug auf die gefärbten Marker sind in den Abbildungen 19 und 20 zusammengestellt. Die zugehörigen Werte sind in Anhang-Tabelle 3 detailliert aufgelistet. In den Anhang-Tabellen 4 bis 6 finden sich weitere Informationen zu den einzelnen Spendern/Proben jeder Gruppe.

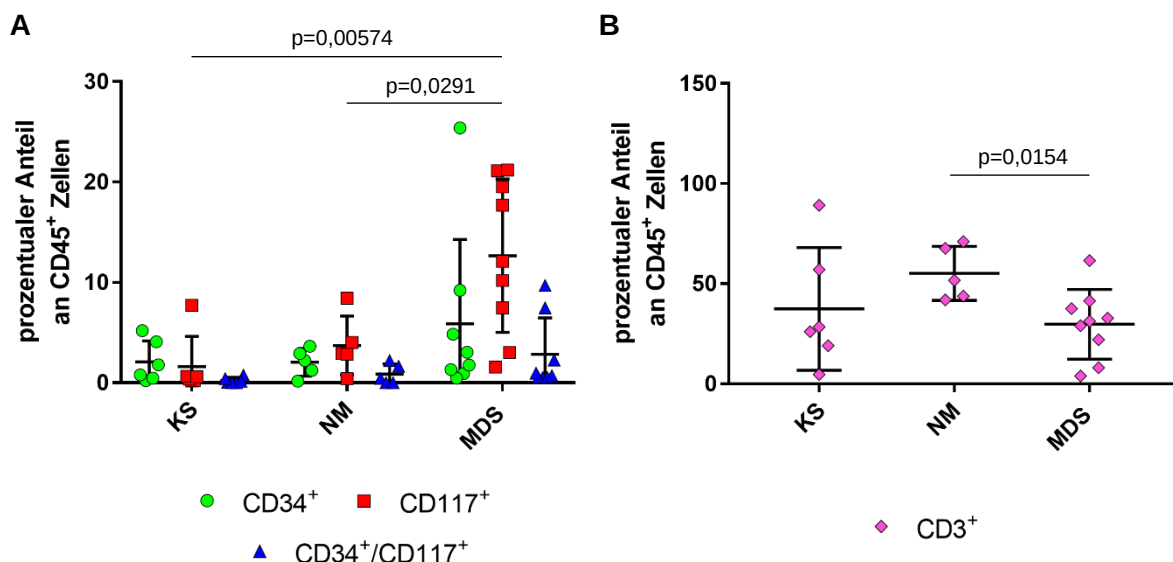


Abb. 19: Prozentualer Anteil der CD34⁺, CD117⁺ und CD34⁺/CD117⁺ (A) bzw. der CD3⁺ (B) Zellen an CD45⁺ Zellen in den Körperspender-(KS), nicht-MDS- (NM) bzw. MDS-Proben nach durchflusszytometrischer Analyse. Es sind die prozentualen Anteile der Zellen vergleichend zwischen den drei Probengruppen dargestellt. n=5-9, $\pm$ SD; dargestellt ist $p < 0,05$.

Bis auf eine MDS-Probe sind alle in der IPSS_R Scoring Risikogruppe *high* eingeordnet. Die eine verbleibende Probe (Nr. 6) stammt aus der Risikogruppe *very low*. Die Varianz innerhalb der Gruppe ist bei allen untersuchten Oberflächenmarkern so groß, dass Probe 6 keinen eigenen Stellenwert erhält, sondern in das Gesamtbild des MDS-Knochenmarks passt. Allerdings wird sie bei den statistischen Vergleichen von MDS und nicht-MDS, wie in den Abbildungen 19 und 20 dargestellt, nicht berücksichtigt. In Abbildung 20A wird deutlich, dass der Marker CD34, ein Zelloberflächenprotein unreifer Blutvorläuferzellen (Blasten) [117], in den MDS-Proben höhere Werte aufweist als in den Vergleichsgruppen KS und NM. Ein identisches Bild stellt sich für CD117, ebenfalls ein Blastenmarker [117], der in der MDS-Gruppe signifikant höher ausfällt, verglichen mit den beiden Kontrollgruppen dar. Ebenso verhält es sich für die doppelt positiven, also CD34⁺/CD117⁺, Zellen. Auch hier liegt der Anteil doppelt positiver Zellen in der MDS-Gruppe tendenziell höher als in den Kontrollgruppen. Invers dazu, weist der in Abbildung 20 B dargestellte T-Zellmarker CD3 [117] in den MDS-Proben einen signifikant niedrigeren Zellanteil als in den NM-Proben auf. Die Verteilung der T-Zellsubpopulationen CD4⁺ und CD8⁺ Zellen ist in Abbildung 20 dargestellt.

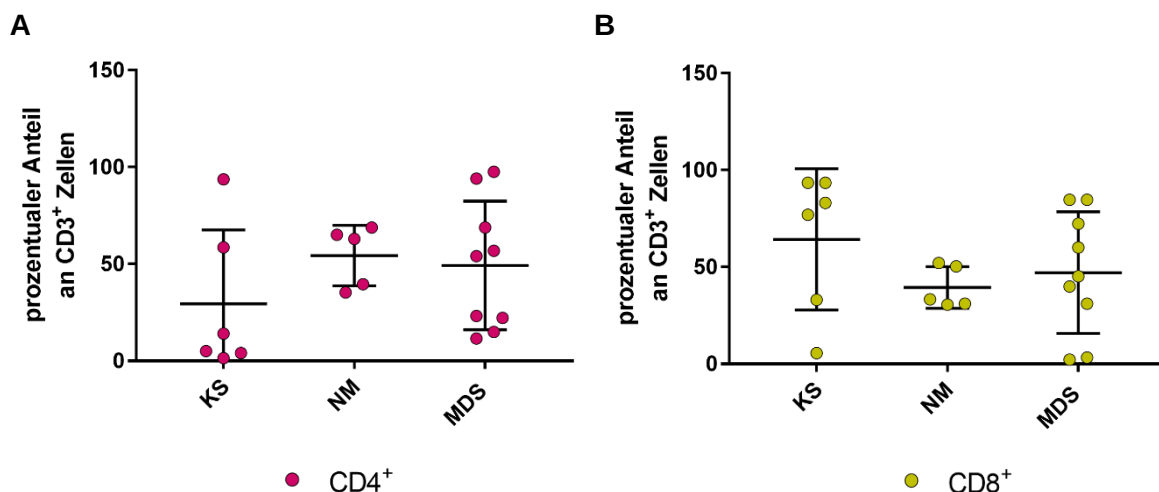


Abb. 20: Prozentualer Anteil der CD4⁺ (A) bzw. der CD8⁺ (B) Zellen an CD3⁺ Zellen in den Körperspender-(KS), nicht-MDS- (NM) bzw. MDS-Proben nach durchflusszytometrischer Analyse. Es sind die prozentualen Anteile der Zellen vergleichend zwischen den drei Probengruppen dargestellt. n=5-9, $\pm$ SD.

Trotz der signifikant erniedrigten Gesamt-T-Zellpopulation (Abb. 19B) in den MDS-Proben, wird in Abbildung 20A und 20B kein signifikanter Unterschied in der Zusammensetzung dieser aus den Subpopulationen CD4 und CD8 ersichtlich.

4.2.2 Vergleichende Expressionsanalyse mittels *Gene Chip™ miRNA 4.0 Array*

Um einen Überblick über die Expressionslevel möglichst vieler mikroRNAs auf einmal zu erhalten, wurden die RNA-Proben aus 3.5.2 mittels des *GeneChip™ miRNA 4.0 Array* im *Affymetrix GeneChip Scanner* in der *Core Facility* Analyse der Martin-Luther-Universität Halle analysiert. Dieser Array erlaubt das *Profiling* von 2578 humanen, maturen mikroRNAs. Es wurden je 3 Proben der nicht-MDS- bzw. MDS *high-risk*-Gruppe analysiert, wobei von jeder Probe sowohl die CD4⁺ als auch die CD8⁺ Zellen analysiert wurden.

Für die Auswertung der Experimente wurde eine Kooperation ebenfalls mit der *Core Facility* Analyse genutzt. So konnten 21 zwischen MDS- und nicht-MDS-Proben signifikant differentiell exprimierte mikroRNAs in CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen entdeckt werden. Diese sind in Abb. 21 detailliert aufgeführt.

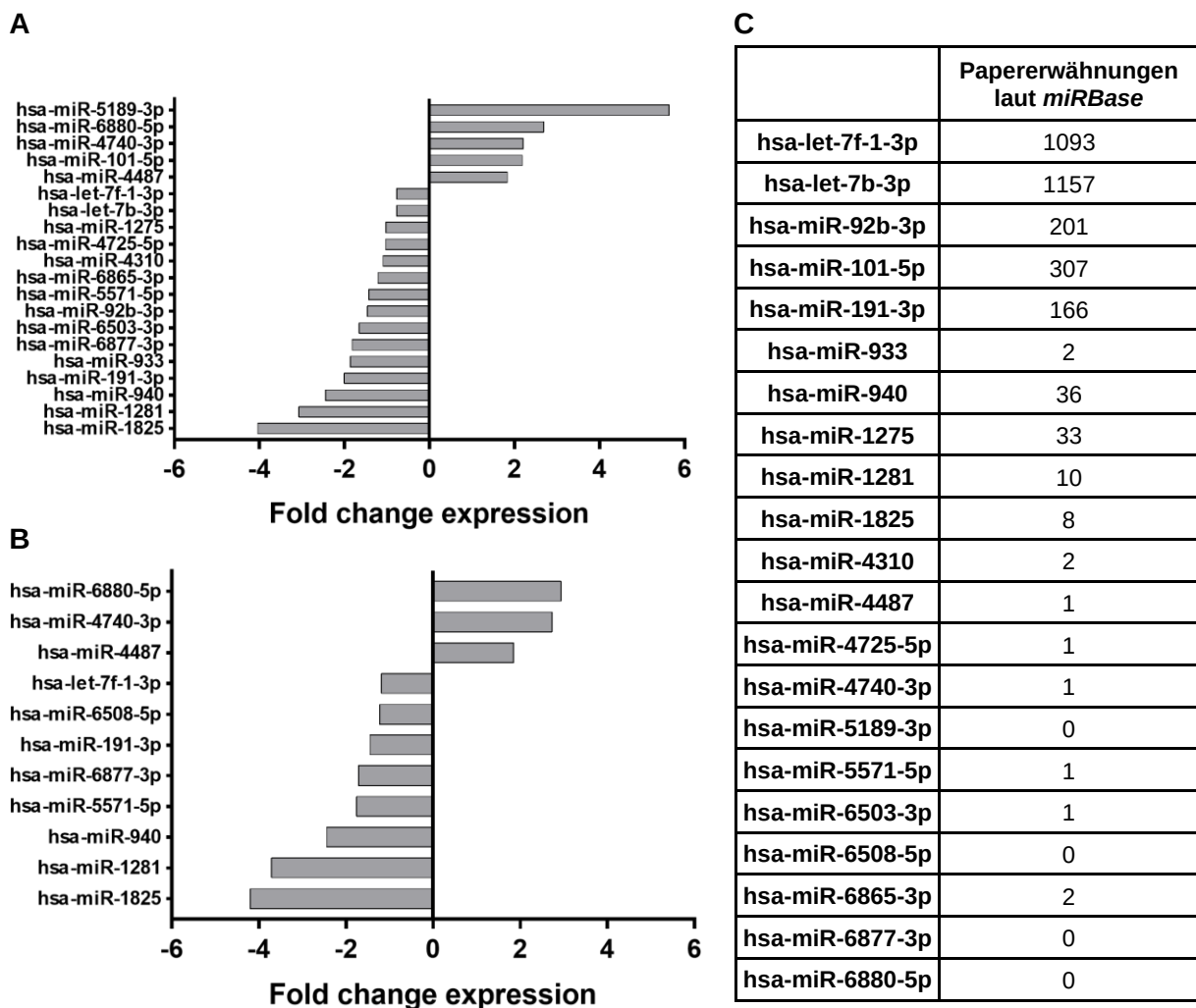


Abb. 21: Signifikant differentiell exprimierte mikroRNAs der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in MDS-Knochenmark. Dargestellt sind die 20 signifikant differentiell exprimierten mikroRNAs der CD8⁺ T-Zellen (A) und die 11 differentiell exprimierten mikroRNAs der CD4⁺ T-Zellen (B) aus MDS-Knochenmarksproben im Vergleich zu nicht-MDS-Knochenmarkproben, jeweils sortiert nach der *Fold change expression*. Insgesamt sind es 21 verschiedene mikroRNAs, die nach aufsteigender Nummer sortiert inklusive ihrer Papererwähnungen laut *miRBase* tabellarisch dargestellt sind (C). Es wurden insgesamt 12 Proben (3 pro Gruppe) mit Hilfe des *GeneChip™ miRNA 4.0 Array* analysiert.

Von den 21 identifizierten differentiell exprimierten mikroRNAs sind 20 den CD8⁺ T-Zell Analysen zuzuordnen (Abb. 21A). Von diesen ist wiederum der Großteil, insgesamt 15 mikroRNAs, in den MDS-Proben signifikant niedriger exprimiert als in den CD8⁺ T-Zellen der nicht-MDS-Knochenmarkvergleichsproben. Dies gibt die *Fold change expression* mit Werten zwischen -4,0 und -0,7 an. Nur 5 der identifizierten mikroRNAs sind in MDS-Proben signifikant höher exprimiert, mit einer *Fold change* zwischen 1,8 und 5,6. In den CD4⁺ T-Zellen konnten nur 11 unterschiedlich exprimierte mikroRNAs identifiziert werden. Auch hier ist der geringere Teil, 3 mikroRNAs, höher exprimiert und der Großteil, 8 mikroRNAs, geringer exprimiert im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen der nicht-MDS-Vergleichsproben. Die einzigen drei höher exprimierten mikroRNAs miR-6880-5p, miR-4740-3p und miR-4487 wiesen bei den CD8⁺ T-Zellen eine ebenso erhöhte *Fold change expression* auf. Auch die in CD4⁺ T-Zellen niedriger exprimierten mikroRNAs, bis auf miR-6508-5p, sind ebenso unter den niedriger exprimierten mikroRNAs der CD8⁺ T-Zellen zu finden. Auch hier wieder mit identischen *Fold change* Werten. Die einzig exklusive, nur in CD4⁺ T-Zellen differentiell exprimierte mikroRNA ist damit miR-6508-5p. Dagegen gibt es 2 mikroRNAs, miR-5189-3p und miR-101-5p, die ausschließlich in CD8⁺ T-Zellen höher und 8 mikroRNAs, hsa-let-7b-3p, miR-1275, miR-4725, miR-4310, miR-6865-3p, miR-92b-3p, miR-6503-3p und miR-933, die niedriger exprimiert werden. Auch wird ersichtlich, dass mit steigender Nummerierung der mikroRNAs, deren Papererwähnungen nach *miRBase* weniger werden bzw. bei 4 mikroRNAs noch gar keine Publikationen vorliegen (Abb. 21C).

Für weiterführende Analysen wurden 3 mikroRNAs ausgewählt, die in CD8⁺ T-Zelluntersuchungen detaillierter untersucht werden sollten. Dabei handelt es sich um miR-1825, miR-1281 und miR-5571-5p. Alle drei mikroRNAs sind in den MDS-Proben deutlich niedriger exprimiert als in den nicht-MDS-Vergleichsproben und dies sowohl in CD8⁺, als auch CD4⁺ T-Zellen.

Die Validierung der *Array*-Daten wurde für ausgewählte mikroRNAs mittels qPCR mit den verbliebenen Resten der Sortierungsproben durchgeführt. Dabei konnte mittels der qPCR-Methode ein zu den *Array*-Daten identisches Expressionsmuster für die untersuchten mikroRNA-Kandidaten zueinander ermittelt werden (Anhang-Abbildung 3).

4.3. Zellfunktionsanalysen differentiell exprimierter mikroRNAs in primären humanen T-Zellen

Für die Untersuchungen des Einflusses der hämatopoetischen Krebszellen auf das Immunsystem wurden stellvertretend CD8⁺ T-Zellen eingesetzt. Diese wurden mittels positiver magnetischer Zellsortierung aus den Resten von Blutspendeproben gewonnen, die eine Reinheit der Proben von 94,6 % ($\pm$ 6,3 %; n=36) ermöglichte. Die so gewonnenen CD8⁺ T-Zellen wurden anschließend mit den hämatopoetischen Zelllinien mit einer Effektor-Target-Ratio von 2:1 in eine *in vitro*-Kokultur gebracht, um das Reaktionsvermögen der T-Zellen hinsichtlich ihres Aktivierungslevels in Anwesenheit dieser Krebszellen zu untersuchen. Des Weiteren wurden die 3 in der Array-Analyse identifizierten Kandidaten in CD8⁺ T-Zellen transfiziert und ebenfalls deren Reaktionsvermögen nach miR-Überexpression untersucht.

4.3.1 Etablierung eines Kokulturmodells von CD8⁺ T-Zellen mit hämatopoetischen Leukämiezelllinien

Für die Evaluation des Proliferationsverhaltens sowie der Oberflächenexpression der T-Zellaktivierungsmarker CD25 und CD71 wurden die CD8⁺ T-Zellen mit den leukämischen Zelllinien MDS-L und THP-1 in Kokultur gebracht. Neben der reinen Kokultur der T-Zellen mit den Zelllinien wurden auch Proben mit dem Zusatz des T-Zellaktivierenden Mitogens Phytohämagglutinin (PHA) mitgeführt. Die nach 5-tägiger Kokultur angeschlossene Analyse der genannten Parameter erfolgte durchflusszytometrisch. Für die Analyse der genannten Oberflächenmarker wurde die Färbung der T-Zellen mit entsprechenden Antikörpern gegen CD25 und CD71 wie unter 3.3. beschrieben durchgeführt. Die Untersuchung des Proliferationsverhaltens der CD8⁺ T-Zellen erfolgte hingegen auf Basis einer bei Ansetzen der Kokultur erfolgten Färbung der T-Zellen mit Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE). Dieser zelldurchlässige fluoreszierende Farbstoff bindet an intrazelluläre Moleküle und wird bei einer Zellteilung zur Hälfte an die Tochterzelle weitergegeben, was mit voranschreitenden Zellteilungen zu einer stetigen Abnahme der Fluoreszenz führt. Dieser Umstand ermöglicht es, Tochterpopulationen durchflusszytometrisch zu identifizieren, wodurch wiederum Rückschlüsse auf das Proliferationsverhalten der Ausgangspopulation gezogen werden können. Die CFSE-Färbung einer nicht proliferierten Probe im Vergleich zu einer Probe mit einer proliferierten Zellpopulation ist in Abbildung 22 dargestellt.

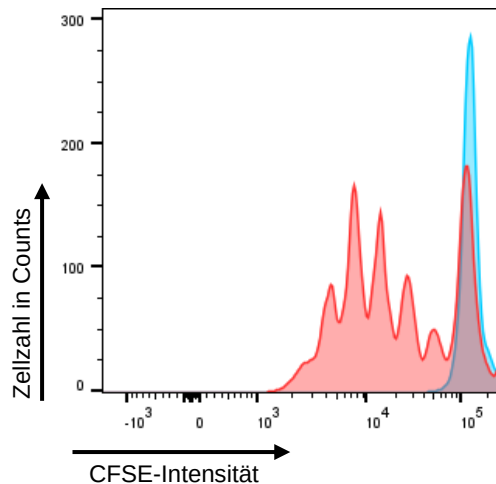


Abb. 22: Repräsentative Darstellung CFSE-gefärbter Proben, sowohl proliferiert (rot) als auch nicht proliferiert (blau). Die CFSE-Färbung der CD8⁺ T-Zellpopulation einer Probe zeigt einen Peak (blau) in der nicht proliferierten und 6 Peaks in der proliferierten Probe (rot).

Der blaue Peak repräsentiert die nicht proliferierte Probe mit hoher CFSE-Intensität, wohingegen die Zellen der proliferierten Probe in rot mehrere Peaks aufweisen. Die Höhe des roten Peaks der Ursprungspopulation lässt auf eine deutlich geringere Zellzahl zugunsten der Tochterpopulationen schließen, deren CFSE-Intensität mit steigender Zellteilung immer mehr abnimmt. Anhand dieser Aufteilung kann der prozentuale Anteil der nicht proliferierten und proliferierten Zellen ermittelt werden. Letzterer ist für die Proben der Kokultur und deren Kontrollproben in Abbildung 24 graphisch dargestellt.

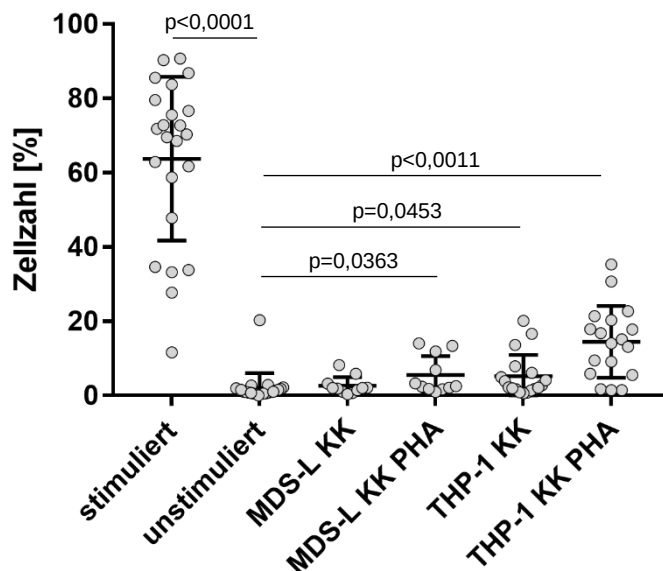


Abb. 23: Prozentualer Anteil der proliferierten Zellen der Kontroll- und Kokulturproben. Dargestellt sind der prozentuale Anteil der CD8⁺ T-Zellen der stimulierten (Anti-CD3-Stimulation (1 µg/ml) und 500 U/ml IL-2) und nicht-stimulierten Kontrollproben (A), als auch der Anteil der proliferierten T-Zellen in den Kokulturproben (KK) der MDS-L und THP-1-Zellen, jeweils mit und ohne PHA (MDS-L 1 µg/ml bzw. THP-1 0,5 µg/ml). n=11-23; ±SD; dargestellt ist p<0,05.

Wie in Abbildung 23 ersichtlich wird, ist der Anteil proliferierter Zellen in der unstimulierten Gruppe signifikant niedriger, als in der Gruppe der mit Anti-CD3 (1 µg/ml) und 500 U/ml IL-2 stimulierten CD8⁺ T-Zellen. Nur ca. 2 % der Zellen der nicht stimulierten, auch als Negativkontrolle bezeichneten, Probe proliferierten. Dem gegenüber steht die stimulierte, auch als Positivkontrolle bezeichnete Probe der CD8⁺ T-Zellen, in der 63,7 % der Zellen proliferierten.

Die Inkubation der CD8⁺ T-Zellen mit den leukämischen Zelllinien THP-1 und MDS-L zeigt deutlich niedrigere Proliferationszahlen. Die MDS-L-Zellen in Kokultur (KK) mit den CD8⁺ T-Zellen bewirken nur eine 2,6 %ige Proliferation dieser. Die Proliferation der T-Zellen in Kokultur mit den MDS-L-Zellen lässt sich durch den Einsatz von 1 µg/ml PHA im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant auf 5,5 % steigern. Der Anteil von proliferierten CD8⁺ T-Zellen in Kokultur mit THP-1-Zellen liegt mit 5,2 % nahezu doppelt so hoch, als die der Kokultur mit MDS-L und ist ebenfalls signifikant höher als in der Negativkontrolle. Hier lässt sich auch unter Einsatz von 0,5 µg/ml PHA in der Kokultur eine weitere Steigerung der proliferierten CD8⁺ T-Zellen auf 14,4 % erzielen. Dieser Wert ist auch signifikant höher, als der der Kokultur mit MDS-L-Zellen unter PHA-Einwirkung.

Die künstliche Stimulierung ruft ein weitaus stärkeres Proliferationsverhalten der CD8⁺ T-Zellen hervor, als es die Kokulturen mit MDS-L- bzw. THP-1-Zellen vermögen. Wobei hier die THP-1-Zellen die stärkere Proliferation hervorrufen. Die parallele Stimulation der Kokulturen mit PHA hat in der THP-1 Kokultur eine signifikante Steigerung der CD8⁺ Zellproliferation zur Folge.

Parallel zur Auswertung der Proliferation erfolgte die Evaluation der bereits genannten Oberflächenmarker CD25 und CD71, die in Abb. 25 dargestellt ist. Es ist zu erwähnen, dass die als CD71⁺ gekennzeichneten Datenpunkte die Gesamtzahl der CD71 exprimierenden Zellen der Probe, auch die CD25⁺/CD71⁺, angibt. Ebenso verhält es sich mit den CD25⁺ Zellen.

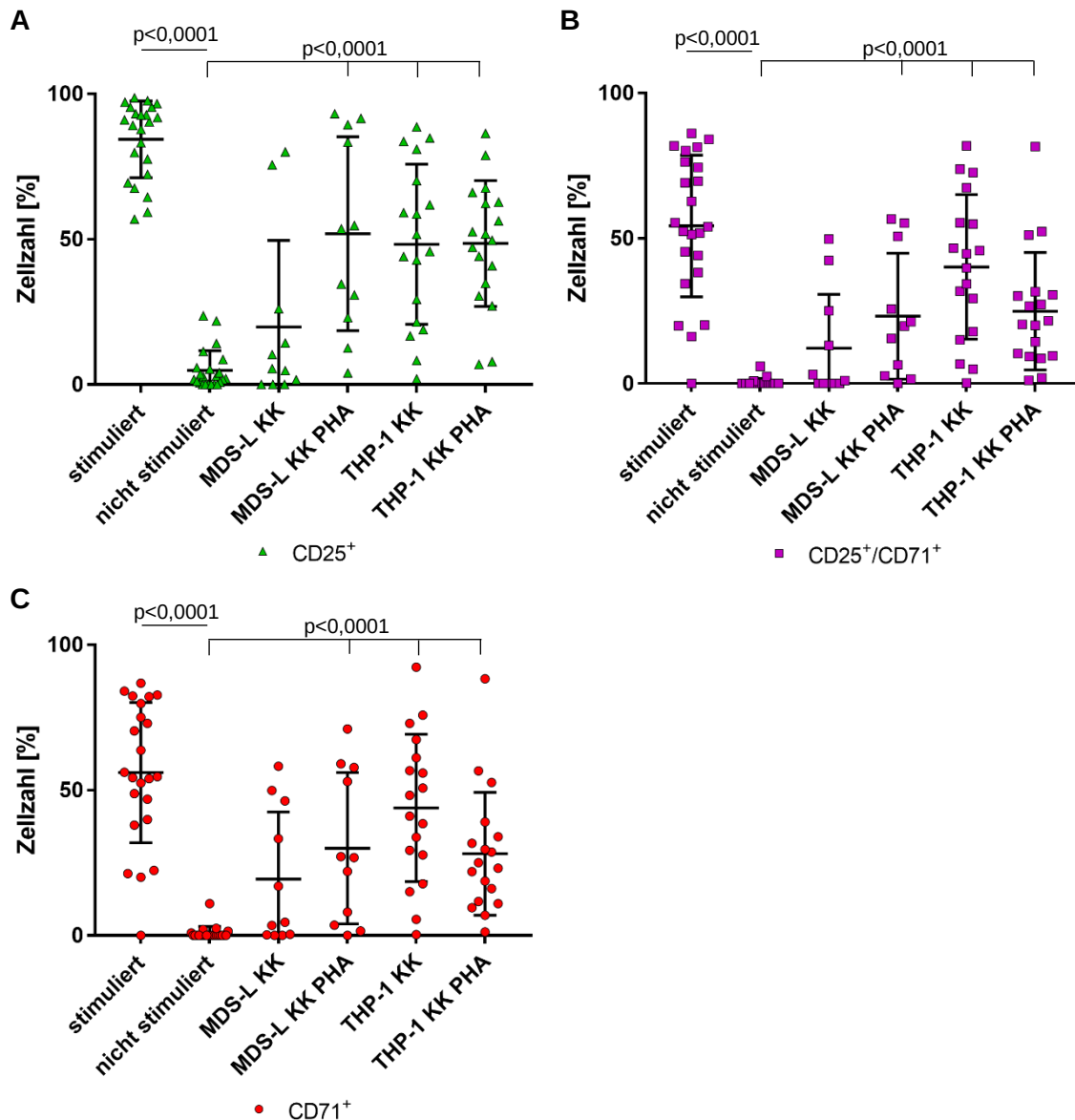


Abb. 24: Prozentualer Anteil der CD25⁺ (A), CD25⁺/CD71⁺ (B) bzw. CD71⁺ Zellen (C) der proliferierten Zellen der Positiv- (stimuliert) und Negativkontrollen (nicht stimuliert), der MDS-L-Kokultur (KK) bzw. der THP-1-Kokultur. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der CD25⁺, CD25⁺/CD71⁺ bzw. CD71⁺ Zellen der proliferierten CD8⁺ T-Zellen. n=11-23; $\pm$ SD; dargestellt ist $p < 0,0001$.

Die in Abbildung 24A illustrierte Graphik stellt den Anteil der CD25⁺ Zellen der proliferierten Zellen der stimulierten und nicht stimulierten Kontrolle, sowie den Kokulturproben der MDS-L- und THP-1-Zellen dar. In der Abbildung wird deutlich, dass in der stimulierten Probe signifikant mehr CD25⁺ Zellen zu finden sind als in der nicht stimulierten Probe. Identisch sieht es für die MDS-L- Kokultur mit PHA und die THP-1-Kokultur sowohl mit als auch ohne PHA aus. Durch die Zugabe von 1 μ g/ml PHA zur Kokultur mit MDS-L kann eine deutliche Steigerung der CD25⁺ Zellen auf mehr als das Doppelte verzeichnet werden. In der stimulierten Positivkontrolle befinden sich ebenfalls signifikant mehr doppelte, also CD25 und CD71 positive Zellen verglichen mit der nicht stimulierten Probe, wie in Abbildung 24B dargestellt.

Ebenso signifikant erhöht kann diese Zellpopulation auch in den Proben der MDS-L-Kokultur mit PHA und den THP-1-Kokulturen mit und ohne PHA nachgewiesen werden. Abbildung 24C stellt die Zahl der CD71 positiven Zellen dar. Es wird deutlich, dass auch hier die Positivkontrolle signifikant mehr CD71⁺ Zellen als die Negativkontrolle aufweist. Identisch zu den beiden Abbildungen 25A und 25B haben die Kokultur mit MDS-L und die Kokulturen mit THP-1 mit und ohne PHA signifikant höhere CD71⁺ Zellzahlen als die nicht stimulierte Probe. Die Oberflächenmarker CD25 und CD71 werden nahezu kaum auf proliferierten, nicht aktivierten CD8⁺ T-Zellen exprimiert. Eine Stimulation dieser Zellen bewirkt allerdings einen starken Anstieg der CD25- und CD71-Expression auf der Oberfläche proliferierter CD8⁺ T-Zellen. Dabei ruft die artifizielle Stimulation mit Anti-CD3 und IL-2 eine weitaus stärkere Reaktion als die Kokultur mit den Zelllinien THP-1 und MDS-L hervor. Die zusätzliche Einwirkung von PHA in den Kokulturen bewirkt sowohl eine Expressionssteigerung von CD71 und CD25 in der MDS-L-Kokultur, als auch eine Verminderung der Oberflächenexpression von CD71 in der THP-1-Kokultur.

4.3.2 Proliferation und Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen nach transienter Überexpression ausgewählter mikroRNA-Kandidaten

Aus den in der mikroRNA-*Microarray*-Analyse identifizierten differentiell exprimierten mikroRNAs wurden 3 Kandidaten für weiterführende Experimente herausgefiltert. Diese mikroRNAs, miR-1825, miR-1281 und miR-5571-5p, wurden anschließend mittels des Polymer-basierten Transfektionsverfahrens via *Viromer®GREEN* in primäre CD8⁺ T-Zellen transfiziert und die Überexpression mittels qPCR validiert (Abb. 25).

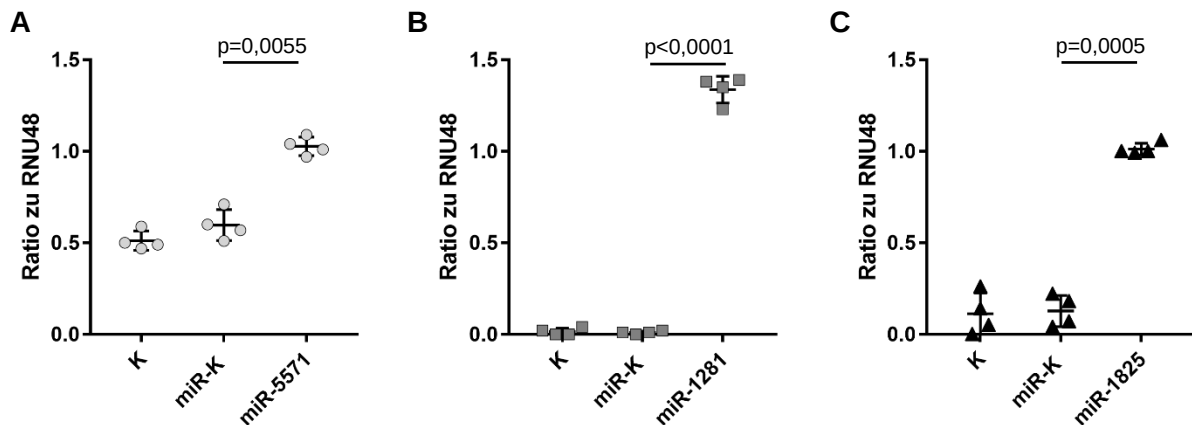


Abb. 25: Überexpression der mikroRNAs miR-5571 (A), miR-1281 (B) und miR-1825 (C) in primären CD8⁺ T-Zellen. Dargestellt sind jeweils die Expressionslevel der mikroRNAs in den unbehandelten Kontrollen (K), den mit der *mimic*-Kontrolle transfizierten Proben (miR-K) und den mit miR-*mimics* transfizierten Proben im Verhältnis zum *Housekeeper* RNU48. n=4; $\pm$ SD; dargestellt ist $p < 0,05$.

In Abbildung 25A ist zu sehen, dass miR-5571 moderat im Vergleich zum *Housekeeper* RNU48 in primären CD8⁺ T-Zellen exprimiert wird und durch mikroRNA-*mimic* Transfektion auch signifikant überexprimiert werden konnte. MiR-1281 hingegen wird nahezu gar nicht in CD8⁺ T-Zellen exprimiert, kann aber auch nach transients Transfektion signifikant überexprimiert werden (Abb. 25B). Der letzte Kandidat, miR-1825, ist in Abbildung 25C dargestellt und weist eine etwas höhere Basisexpression als miR-1281 auf, wenn auch noch deutlich unter der von miR-5571. Auch diese mikroRNA konnte mittels *mimic*-Transfektion signifikant überexprimiert werden.

Diese transfizierten CD8⁺ T-Zellen wurden nach der 48-stündigen Transfektionsphase entweder CFSE-gefärbt und für die Analyse des Proliferationsverhaltens und der Oberflächenmarkerexpression mit Anti-CD3 (1 μ g/ml) und IL-2 stimuliert bzw. nicht stimuliert oder ohne CFSE-Färbung in den unter Abschnitt 3.2.6 erläuterten CD107a-Assay gegeben. Das Proliferationsverhalten dieser transfizierten Zellen ist der folgenden Abbildung 26 dargestellt.

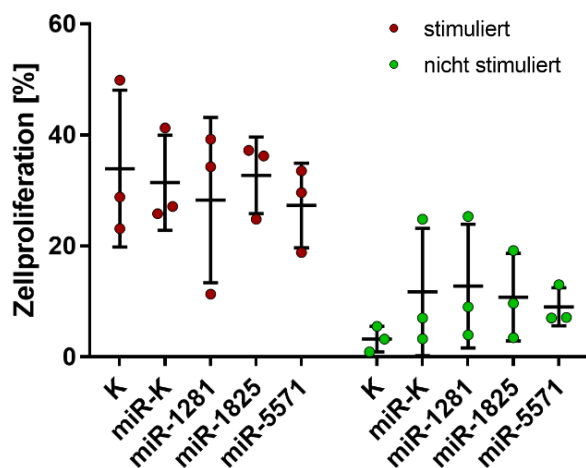


Abb. 26: Prozentualer Anteil der proliferierten Zellen der stimulierten bzw. nicht stimulierten transfizierten CD8⁺ T-Zellen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der proliferierten CD8⁺ T-Zellen der stimulierten (Anti-CD3-Stimulation (1 μ g/ml) und 500 U/ml IL-2) und nicht-stimulierten Kontrollproben (K) sowie den mit miR-*mimics* transfizierten T-Zellen. n=3; $\pm$ SD.

Die mit Anti-CD3 und IL-2 stimulierten und zuvor mit den aufgeführten mikroRNA-*mimics* transfizierten CD8⁺ T-Zellen lassen im Vergleich zur Kontrolle (34 %) keine signifikanten Unterschiede in ihrer Proliferationsrate erkennen (Abb. 26). Ebenso in den nicht stimulierten transfizierten T-Zellen. Es wird aber auch deutlich, dass die transfizierten Proben, sei es mit der Kontroll-miRNA als auch mit den mikroRNA-*mimics*, eine tendenziell höhere Proliferationsrate zwischen 9 und 13 % im Vergleich zur nicht stimulierten und auch nicht transfizierten Kontrolle mit einer Proliferationsrate von ca. 4 % aufweisen. Identisch zur Analyse der Kokulturen wurden bei diesen Proben die Oberflächenexpressionen der Marker CD25 und CD71 analysiert (Abb. 27).

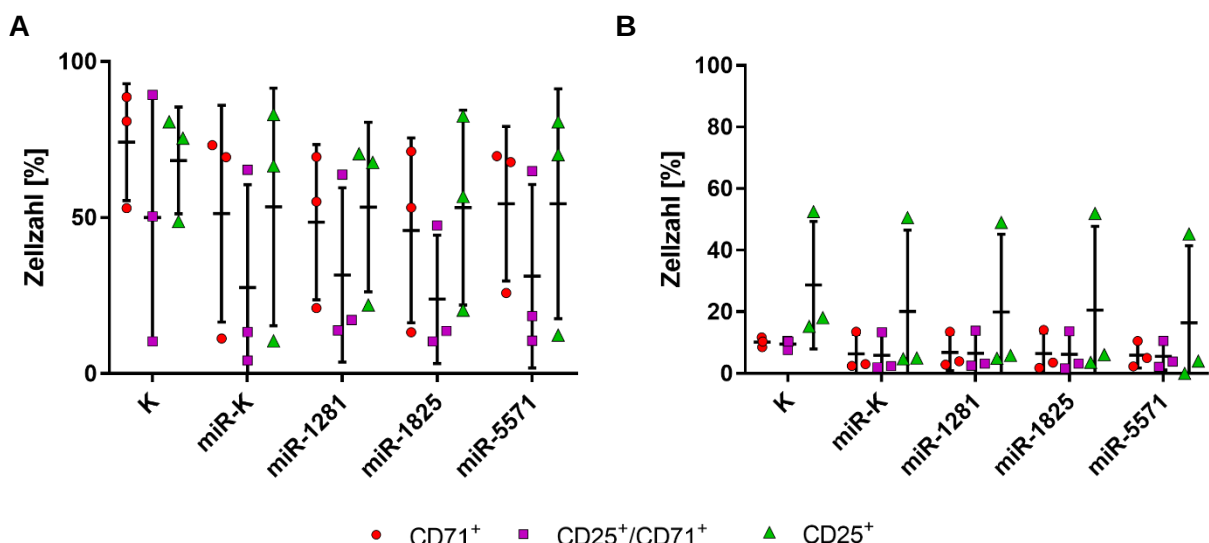


Abb. 27: Prozentualer Anteil der CD71⁺, CD25⁺/CD71⁺ bzw. CD25⁺ Zellen der proliferierten (A) bzw. nicht proliferierten (B) transfizierten und stimulierten (Anti-CD3 und IL-2) CD8⁺ T-Zellen. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der CD71⁺, CD25⁺/CD71⁺ bzw. CD25⁺ exprimierenden Zellen der mit miR-1281, miR-1825 bzw. miR-5571 transfizierten CD8⁺ T-Zellen. n=3; $\pm$ SD.

Auch bei der Oberflächenexpressionsanalyse der Marker CD25 und CD71 auf den mit Anti-CD3 und IL-2 stimulierten proliferierten CD8⁺ T-Zellen lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den mikroRNA-*mimic* transfizierten und den Kontrollproben nachweisen (Abb. 27A). Auch hier ist zu bemerken, wie schon in Abb. 26, dass es auffallende Unterschiede zwischen der nicht transfizierten Kontrolle und den transfizierten Proben gibt. So wird ersichtlich, dass die Oberflächenexpressionen der beiden untersuchten Marker in den transfizierten Proben deutlich niedriger als in der untransfizierten Kontrolle sind. In dieser werden auf ca. 73 % der Zellen CD71 bzw. auf ca. 68 % der Marker CD25 exprimiert. In den transfizierten Proben waren es nur noch knapp 50 bzw. 54 %. Damit einhergehend finden sich auch in den transfizierten Proben um ca. 21 % weniger doppelt positive Zellen. Auch in den stimulierten, nicht proliferierten CD8⁺ T-Zellen (Abb. 27B) findet sich dieses Phänomen. Hier ist allerdings wie erwartet die Oberflächenexpression von CD25 und CD71 der Kontroll-, als auch der transfizierten Proben deutlich geringer als die auf den proliferierten Zellen.

Ca. 11 % der Zellen der Kontrollprobe und ca. 7 % der transfizierten Proben exprimieren CD71. CD25 wird hingegen in den Kontrollproben auf ca. 31 %, in den transfizierten Proben noch auf knapp 22 % der Zellen exprimiert. Die Werte der CD71 positiven Zellen entsprechen auch nahezu denen der doppelt positiven Zellen.

Weiterhin wurde die Expression des Degranulationsmarkers CD107a auf den transfizierten Zellen untersucht. Dieses Molekül dient als Marker der Zytotoxizitätsaktivität unter anderem von CD8⁺ T-Zellen, dessen Oberflächenexpression nach Aktivierung der Zellen stark ansteigt [118]. Die Expression dieses Markers kann durchflusszytometrisch analysiert werden und ist für stimulierte, nicht-stimulierte und mit MDS-L-Zellen in Kokultur gebrachte T-Zellen exemplarisch in Abbildung 28 dargestellt.

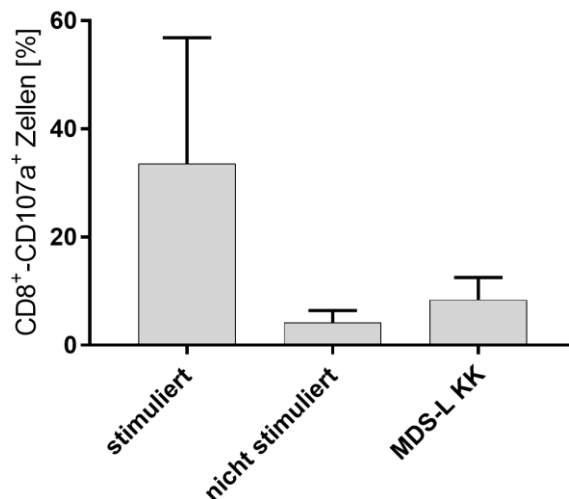


Abb. 28: Prozentualer Anteil der CD107a⁺ CD8⁺ T-Zellen unter Stimulation und in Kokultur mit MDS-L-Zellen Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD8⁺- CD107a⁺- T-Zellen der stimulierten (Anti-CD3-Stimulation (1 µg/ml) und 500 U/ml IL-2, pK) nicht-stimulierten (nK) sowie den in Kokultur mit MDS-L-Zellen befindlichen T-Zellen. n=3; ±SD.

Die mit IL-2 und Anti-CD3 stimulierten Proben weisen eine deutlich höhere CD107a-Expression auf den CD8⁺ T-Zellen auf im Vergleich zu nicht stimulierten bzw. mit MDS-L-Zellen in Kokultur gebrachte T-Zellen. Allerdings wird auch ersichtlich, dass die CD8⁺ T-Zellen der Kokultur ungefähr doppelt so viele CD107a⁺ T-Zellen wie die nicht stimulierte Negativkontrolle aufweisen.

Die Ergebnisse der CD107a-Expression mikroRNA-transfizierter CD8⁺ T-Zellen ist in Abbildung 29 dargestellt.

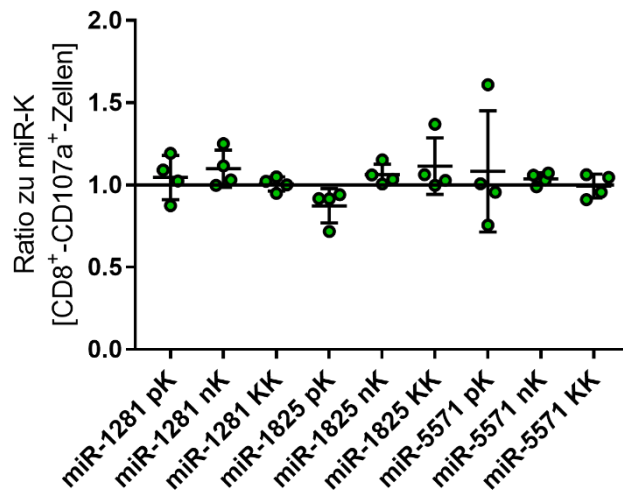


Abb. 29: Prozentualer Anteil der CD107a⁺ miR-transfizierten CD8⁺ T-Zellen unter verschiedenen Konditionen im Vergleich zur miR-kontroll-transfizierten Probe. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD8⁺-CD107a⁺-T-Zellen der stimulierten (Anti-CD3-Stimulation (1 µg/ml) und 500 U/ml IL-2, pK) nicht-stimulierten (nK) sowie den mit miR-mimics transfizierten in Kokultur mit MDS-L-Zellen befindlichen T-Zellen. Die Proben sind auf die miR-Kontrolle normalisiert. n=4; ±SD.

Die CD107a-Expressionslevel der einzelnen Proben wurden ins Verhältnis zur miR-kontroll-transfizierten Probe gesetzt, die somit den Wert 1 repräsentiert. Wie Abbildung 29 deutlich macht, gibt es keine signifikanten Unterschiede der einzelnen Proben im Vergleich zur entsprechenden mitgeführten Kontrolle. Die mit miR-1825 transfizierten und anschließend stimulierten CD8⁺ T-Zellen weisen allerdings eine Tendenz zur verminderten Expression von CD107a auf. Dieser Effekt ist allerdings unter Kokulturbedingungen mit MDS-L-Zellen nicht ersichtlich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Überexpression von miR-1281, miR-1825 und miR-5571 in CD8⁺ T-Zellen keinen signifikanten Einfluss auf das Proliferationsverhalten oder das Expressionsmuster von CD25 und CD71 der Zellen hat. Auch die Expression des Degranulationsmarkers CD107a auf den CD8⁺ T-Zellen offenbart keine signifikanten Veränderungen nach Überexpression der genannten mikroRNAs.

5. Diskussion

5.1. Der Einfluss verschiedener in MDS differentiell exprimierter mikroRNAs auf biologische Prozesse in MDS-L- und THP-1-Zellen

5.1.1 Erfolgreiche THP-1 und MDS-L Differenzierung ohne eindeutige Beeinflussung durch mikroRNA-Überexpression

Bisherige Untersuchungsmodelle zur Erforschung der Entstehung und den Progress von MDS basieren auf dem Nutzen von Zelllinien, die allerdings nicht immer MDS-Ursprung besitzen [107]. Auch Mausmodelle, wie zum Beispiel *JUN* stellen geeignete Studienobjekte für die MDS-Forschung dar. Diese Mauslinie bildet unter *Specific pathogen-free* (SPF) Bedingungen spontan MDS aus [119]. Des Weiteren sind Modelle etabliert, die geeignete Kulturbedingungen für die in vitro-Untersuchung der anspruchsvollen hämatopoetischen Stammzelle bzw. den Vorläuferzellen aus Patientenproben beleuchten. Dies wiederum erlaubt es, Teile der Stammzelldifferenzierung in diesen Modellsystemen zu untersuchen [120]. In der vorliegenden Arbeit wird neben der vielbeschriebenen und gut untersuchten Vorläuferzelllinie THP-1 [121] auch die weniger gut untersuchte Zelllinie MDS-L genutzt. Die MDS-L-Zelllinie hat ihren Ursprung im Knochenmark eines männlichen Patienten, der zum Zeitpunkt der Probennahme mit MDS diagnostiziert wurde. Dem gegenüber steht die THP-1-Zelllinie, die aus dem peripheren Blut eines AML-Patienten stammt (Anhang-Tabelle 1). Der parallele Einsatz dieser beiden Zelllinien erlaubt am Ende auch einen Vergleich zwischen MDS und AML.

THP-1-Zellen sind wie bereits erwähnt ein weit verbreitetes Modell zur Untersuchung von Makrophagen und dendritischen Zellen (DC). Da der Zugang zu primären Gewebsmakrophagen mit Einschränkungen wie unter anderem geringen Zellzahlen verbunden ist, werden monozytäre Zelllinien zu Makrophagen und dendritischen Zellen differenziert und untersucht. So konnten Hölken et al. eine Differenzierung der THP-1-Zellen durch PMA mit einer einhergehenden Hochregulation von CD86 und dem Phagozytosemarker CD11b beobachten, was die THP-1-Differenzierung zu dendritischen Zellen belegt [108]. Daigneault et al. konnten zudem zeigen, dass die Stimulation der THP-1-Zellen gefolgt von einer Ruhephase ohne PMA für 5 Tage weitere Veränderungen wie zum Beispiel den Anstieg von intrazellulären Mitochondrien und Lysosomen induziert, die den entstandenen Phänotyp der differenzierten THP-1-Zellen noch näher an den der primären von Monozyten abgeleiteten Makrophagen bringt [122]. Ebenso konnten auch Gopinath et al. nach einer der Stimulation angeschlossenen Ruhephase ohne PMA vermehrt Makrophagendifferenzierungsmerkmale wie eine erhöhte CD14 Expression auf den Zellen detektieren [123].

Auch in für diese Arbeit durchgeführten Vorversuchen (Anhang-Abbildung 1) verursachte PMAr deutlich höhere Oberflächenexpressionen der Marker CD11b, CD11c und CD86 als in der einfachen PMA-Stimulation von 48 h. So bewirkt die Stimulation der hier verwendeten THP-1-Zellen mit PMAr einen Anstieg der Marker CD11b, CD11c und CD86, aber nicht von CD14. Somit kann eine erfolgreichen Differenzierung in Richtung der dendritischen Zellen angenommen werden, da auch CD11c ein dendritischer Zellmarker ist [124]. Ebenso unterstützend für diese Aussage ist das Fehlen der CD14 Expression, welcher eher als klassischer Monozyten-Makrophagen-Marker bekannt ist [125], auch wenn Dutertre et al. im Blut ein CD14⁺ DC-Subset identifizieren konnten [126]. Liu et al. konnten aufdecken, dass die Länge der Stimulationsphase und die Anzahl der ausgesäten THP-1-Zellen zu Beginn des Experiments einen signifikanten Einfluss auf die CD14 Expression ausüben. So hat die CD14 Expression nach 24 h Stimulation und mit 1×10^5 ausgesäten Zellen seinen Höhepunkt, wohingegen länger andauernde Stimulationen und höhere Zellzahlen einen signifikanten Abfall der CD14 Expression bewirken [127]. Dies könnte unter anderem ein Grund dafür sein, warum in den hier eingesetzten THP-1-Zellen keine Steigerung der CD14-Expression unter den gegebenen Bedingungen zu verzeichnen war. Ein weiterer Grund könnte in der von Ben-David et al. beschriebenen genetischen und transkriptionellen Evolution von Zelllinien in den verschiedenen Laboren liegen, was wiederum offenlegt, dass in unterschiedlichen Laboratorien genutzte Populationen einer Zelllinie nicht zu 100 % identisch sind [128]. Ein sich mit der PMAr-Stimulation deckendes Bild konnte für die Stimulation der THP-1-Zellen mit ATRA präsentiert werden, die eine starke Expression der Marker CD11b, CD11c und CD86 zur Folge hatte, was auch von Cho et al. nachgewiesen werden konnte [109]. Wie auch bereits Hmam et al. dokumentiert haben, kann durch die VitD₃-Stimulation die Expression von CD14 sehr stark und etwas weniger prominent die von CD11b gesteigert werden, was für Differenzierung in die Makrophagenrichtung spricht [129].

Die Überexpression der in der vorliegenden Arbeit untersuchten mikroRNAs miR-15a, miR-34a und miR-181b konnte in peripheren Blutproben und/oder Knochenmarksproben von MDS-Patienten bereits von mehreren Forschungsgruppen identifiziert werden [7, 8, 104]. Die herunterregulierte Expression von miR-143 und miR-150 ist ebenfalls nachgewiesen [105, 106]. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden alle genannten mikroRNAs erfolgreich in den Zelllinien THP-1 und MDS-L transient überexprimiert.

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführte Überexpression von miR-34a bewirkt unter der Einwirkung aller genannten Stimulantien eine signifikante Erhöhung der CD11b Expression auf THP-1-Zellen, wobei die anderen Marker gar keine bzw. keine übereinstimmenden Erhöhungen oder Erniedrigungen aufweisen. Dies in Kombination mit einer Erhöhung der CD11c Expression unter PMAr-Stimulation spricht für eine partielle

Begünstigung der Differenzierungsinduktion der THP-1-Zellen unter PMA-, ATRA- bzw. VitD₃-Stimulation unter mikroRNA-34a-Überexpression. Da alle drei genutzten Stimulantien unterschiedliche Wege der Differenzierung initiieren, scheint es in allen drei Wegen eine partielle Gemeinsamkeit zu geben, die es miR-34a erlaubt, die explizite Steigerung von CD11b zu gewährleisten. So steuert PMA über den Ras/ERK Signalweg über die Aktivierung von MEK-1/-2 (*mitogen activated protein kinase 1/2*), ERK-1 und ERK-2 (*extracellular signal-regulated kinase 1 und 2*) die entsprechenden Signale zur Zelldifferenzierung [130]. ATRA hingegen steuert dies über den NFκB-Signalweg über Koaktivierung von NFκB und RARα (*retinoic acid receptor α*) [109]. Wohingegen VitD₃ über den mTOR-Signalweg durch die Aktivierung der beiden mTOR-Proteinkomplexe mTORC1 und mTORC2 die Zelldifferenzierung initiiert [110]. Andererseits scheint miR-34a auch in signalwegspezifischen Schritten zu wirken, da nur unter PMA-Stimulation eine zusätzliche CD11c-Steigerung und unter VitD₃-Stimulation eine zusätzliche CD14-Hochregulation zu beobachten sind. Dies würde auch belegen, warum ohne den Einsatz der Stimulantien die miR34a-Überexpression in der Zusammenschau aller drei separat durchgeführten Analysen gar keine signifikanten Veränderungen hervorrufen konnte. Dass miR-34a das Potential zur Induzierung der Zelldifferenzierung besitzt, konnte bereits in Nierenfibroblasten nachgewiesen werden [131]. Das Bild der Hochregulation separater Marker kann auch für die stimulierten und mikroRNA-181b überexprimierenden THP-1-Zellen beobachtet werden, was ebenfalls den eben genannten Schluss der spezifischen Signalwegbeeinflussung zulässt. Dass auch miR-181b an zum Beispiel chondralen bzw. B-Zell-Differenzierungsprozessen beteiligt ist, konnte bereits von Song et al. und Di Marco et al. nachgewiesen werden [132, 133]. Ein weiterer Punkt, der für keinen eindeutigen Einfluss auf die Differenzierung der THP-1-Zellen spricht, ist die unveränderte Expression des onkogenen Transkriptionsfaktors *Pituitary Tumor-Transforming gene 1* (PTTG1). Dieser in hämatologischen Erkrankungen überexprimierte Transkriptionsfaktor kann aber durch den Einsatz von z.B. PMA transkriptionell herunterreguliert werden [111]. Dies konnte zwar in Vorversuchen (Anhang-Abbildung 4) auch explizit für die PMA-Stimulation von THP-1-Zellen bestätigt werden, war aber in den hier dargestellten Daten nicht reproduzierbar.

Mit den hier aufgeführten inkonsistenten Ergebnissen, kann keine eindeutige Aussage über den Einfluss der mikroRNA-Überexpression von miR-34a, miR-143, miR-150 und miR-181b auf das Differenzierungsverhalten von THP-1-Zellen getroffen werden. Es gibt Hinweise auf eine Einflussnahme von miR-34a, miR-150 und miR-181b, die aber für eine eindeutige Aussage in einer größeren n-Zahl wiederholt werden sollten.

Für die MDS-L-Zellen gibt es bisher keine veröffentlichten Daten über deren Verhalten unter PMA- oder ATRA-Stimulation, weshalb diese Ergebnisse Neuwert haben.

Die ATRA-Stimulation bewirkt eine Steigerung der Expression von CD11b und CD11c, aber die CD86 Expression nimmt ab. Unter PMA-Stimulation kommt es wiederum zu einem Anstieg aller vier untersuchten Oberflächenmarker. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass auch die MDS-L-Zellen unter PMA- und ATRA-Einfluss einen Makrophagen/dendritischen Zell-ähnlichen Phänotyp ausprägen. Ein weiteres Merkmal der Differenzierung offenbart sich durch eine verminderte PTTG1-Expression unter ATRA-Stimulation, der auch unter PMA-Stimulation tendenziell erkennbar ist.

Da die MDS-L-Zellen lediglich als Blastenzelllinie definiert sind [107], könnte man anhand dieser Ergebnisse darauf schließen, dass es sich, ähnlich den THP-1-Zellen, um eine monozytäre Blastenform handeln könnte. Eine genaue Zelltypidentifikation sowohl der MDS-L-Zelllinie, als auch der aus den Differenzierungen resultierenden Subreihen stellt für die hier durchgeführten Versuche keine Relevanz dar, weshalb keine weiterführenden Analysen für deren Identifikation bzw. Testung der Funktionalität der differenzierten Zellen durchgeführt wurden. In den MDS-L-Zellen konnte auch die Überexpression von miR-34a, miR-143 und miR-181b keine signifikanten Unterschiede im Expressionsprofil der untersuchten Moleküle aufdecken. Wie schon bei den THP-1-Zellen werden allerdings Tendenzen sichtbar, die aber aufgrund einer weitaus stärker ausgeprägten Inkonsistenz im Oberflächenexpressionsmuster der MDS-L-Zellen zu keinen signifikanten Unterschieden führten.

Sowohl THP-1- als auch MDS-L-Zellen konnten mit Hilfe von PMA, ATRA bzw. VitD₃ erfolgreich differenziert werden, wobei eine genaue Identifikation des resultierenden Zelltyps nicht vorgenommen wurde. Die für dieses Ergebnis untersuchten Oberflächenexpressionsdaten offenbaren unter mikroRNA-Überexpression keine signifikanten Veränderungen, wenn auch Hinweise geliefert wurden, dass zumindest die Überexpression von miR-34, miR-150 und miR-181b in THP-1-Zellen einen Einfluss zu haben scheinen.

5.1.2 Verändertes Proliferationsverhalten der THP-1-Zellen nach miR-34a-Überexpression

Auch bei der Untersuchung des Proliferationsverhaltens über den Einbau fluorophorgekoppelter Basen in neu synthetisierte DNA scheint miR-34a die mikroRNA zu sein, die den größten Einfluss hat, wenn auch nur wieder in den THP-1-Zellen. Bereits Engkvist et al. konnten die proliferationshemmende Wirkung von miR-34a in Brustkrebszellen nachweisen [134], genau wie Yong et al. für Magenkrebszellen [135]. Diese und weitere Publikationen zur antitumoralen Wirkung von miR-34a machen diese mikroRNA zu einem potentiellen Werkzeug der Immuntherapie [136]. Diese Tumorsuppressorfunktion könnte auch ein Grund sein, warum das Basislevel dieser mikroRNA in den hier untersuchten THP-1- und MDS-L-Zellen das geringste Expressionslevel aller hier untersuchten mikroRNAs aufweist.

Die Verminderung der Proliferation vollzieht miR-34a über die Bindung an sein Target *B-cell lymphoma-2* (BCL-2). Dies konnte bereits sowohl vom *prediction tool Target Scan* als auch experimentell in unterschiedlichen Systemen wie Eierstockkrebszelllinien oder neurodegenerativen Mausmodellen mehrfach nachgewiesen werden [137, 138]. Die Inhibierung von BCL-2 und die damit verbundene Unterbindung der Zellproliferation wird außerdem bereits als Therapie, in Form von Venetoclax, bei der Behandlung von MDS eingesetzt [139]. Die Überexpression von miR-34a in MDS-L bewirkt hingegen keine Veränderungen im Proliferationsverhalten der Zellen.

Die Überexpression von miR-143 und miR-181b hat keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der MDS-L- und THP-1-Zellen. Anders sieht das zum Beispiel in Melanomzellen aus, wo miR-143 eine Proliferationsinhibierung bewirkt [140]. Yang et al. konnten identische Ergebnisse bei miR-181b überexprimierenden Kolonkarzinomzellen darstellen [141]. Dies demonstriert, wie vielseitig die Wirkung von mikroRNAs sein kann. Wie bereits erwähnt, kann eine mikroRNA viele Targets binden und wiederum kann ein Target von vielen mikroRNAs reguliert werden. Das dies auch in einem Zellkompartiment abhängigen Muster passiert, zeigt der unterschiedliche Einfluss der mikroRNAs auf das Proliferationsverhalten der unterschiedlichen Zelltypen.

Für die hämatopoetischen Zellen THP-1 und MDS-L kann postuliert werden, dass miR-143 und miR-181b keinen Einfluss auf deren Proliferationsverhalten haben.

MiR-34a, als bereits bekannter Parameter bei der Beeinflussung der Proliferation einer Vielzahl von Zelltypen, ruft bei Überexpression in THP-1-Zellen dagegen ein vermindertes Proliferationsverhalten hervor, nicht aber in MDS-L-Zellen.

5.1.3 Die Überexpression von miR-15a, miR-34a und miR-150 beeinflusst den Zellzyklus von THP-1-Zellen signifikant

Unter PMA-Stimulation verfallen die MDS-L-Zellen in einen Zellzyklusarrest in der G2-M-Phase, die THP-1-Zellen hingegen hauptsächlich in der G1-Phase. Bereits Gazova et al. konnten einen G1-Arrest für THP-1-Zellen nach PMA-Stimulation feststellen [142], wohingegen es für die MDS-L diesbezüglich keine publizierten Daten zum Zellzyklus gibt. Allerdings ist bekannt, dass die Wirkung von Decitabin, einem hypomethylierenden Therapeutikum, ebenfalls einen G2-Arrest bei MDS-L-Zellen auslöst [143].

Der durch die PMA-Stimulation in Gang gesetzte Ras/ERK Signalweg ist neben der schon erwähnten Differenzierung auch für den G1-Arrest in THP-1-Zellen verantwortlich [144]. Dieser Signalweg hat bekanntermaßen auch Auswirkungen auf den Transkriptionsfaktor NFκB [145], was durch eine leichte Hochregulation der NFκB-Untereinheiten p50 und p60 experimentell sowohl in MDS-L- als auch in THP-1-Zellen nachgewiesen werden konnte. Diese können

wiederum auf das cyclinabhängige Kinasen (CDK)-System wirken, das wiederum im Zellzyklus für die Regulation der Zellzyklus-*Checkpoints* verantwortlich ist [146]. Auch die Überexpressionen von miR-34a, miR-15a und miR-150 haben jeweils eine signifikante Verschiebung der Zellzyklusphasen zugunsten der G1-Phase zur Folge, wenn auch nicht in dem Ausmaß wie PMA und ohne die unter PMA-Stimulation erhöhte Expression der NFκB-Untereinheiten. Auch die hämatopoetischen Zellen der Linie K562 verbleiben nach der Überexpression von miR-34a in der G1-Phase [147]. In den Brustkrebszelllinien HCC1806 und MCF-7 bewirkt sie allerdings einen Arrest in der S-Phase [148]. Auch miR-15a ist ein bekannter Regulator des Zellzyklus, der in der Lage ist die hämatopoetischen Zellen K562 [149] als auch die Brustkrebszellen der MDA-MB-231-Linie in einen G1-Arrest zu versetzen [150]. Der durch Überexpression von miR-150 in K562-Zellen induzierte G1-Arrest deckt sich ebenfalls mit denen in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen. Sun et al. geben auch gleichzeitig eine Reihe von am Zellzyklus beteiligten Genen an, deren Expression durch die Überexpression von miR-150 hoch- bzw. herunterreguliert ist und so die zellzyklushemmende Wirkung von miR-150 vermitteln. Allerdings ist nicht nachgewiesen, welche Gene direkte Targets von miR-150 sind oder nur indirekt adressierte Moleküle im miR-150 Signalweg darstellen [151]. Die Zusammenschau der Ergebnisse lässt darauf schließen, dass zumindest miR-15a und miR-150 unabhängig von der Zellart einen ähnlichen Einfluss auf identische CDKs haben. In Kontrast dazu steht miR-34a, deren Überexpression in Abhängigkeit vom Zielgewebe, unterschiedliche Wege des Zellzyklusarrests initiieren kann. Der G1-Arrest in all den transfizierten THP-1-Proben könnte drauf hinweisen, dass die Zellen, wie bereits unter PMA-Stimulation bewiesen, eine Differenzierung durchmachen und in der arretierten G1-Phase wachsen und ihren Zellstoffwechsel auf eine höher differenzierte Zellform einstellen. Die MDS-L offenbaren abgesehen vom bereits erwähnten G2-Arrest unter PMA-Stimulation keine Beeinflussung der einzelnen Zellzyklusphasen unter miR-Überexpression. Der Verbleib der MDS-L-Zellen in der G2-Phase in Verbindung mit der Hochregulation der differenzierungsspezifischen Oberflächenmarker spricht ebenfalls für eine Adaptierung der biologischen Zellprozesse an ein höherdifferenziertes Zellstadium.

5.2. Identifizierung und Einfluss von in MDS differentiell exprimierten mikroRNAs auf T-zelluläre Effektorfunktionen

5.2.1 Zelluläre Verteilungsmuster von Stammzellen und adulten T-Zellen in MDS- und nicht-MDS-Knochenmarkproben

Neben den im ersten Teil der Diskussion beschriebenen Zelllinien, werden im zweiten Teil stellvertretend für die Zellen des adaptiven Immunsystems die T-Zellen näher betrachtet. Diese Zellen haben ebenfalls ihren Ursprung im Knochenmark, aber reifen extramedullär im Thymus heran und können aber wieder in das Knochenmark einwandern und dort Einfluss auf biologische Prozesse nehmen [152]. Die mikroRNA-Profile bisher identifizierter in MDS unterschiedlich exprimierter mikroRNAs beziehen sich auf peripheres Blut oder Gesamtknochenmarkanalysen [7, 8, 104] oder die CD34⁺ Zellsubpopulation [153]. In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls die Gesamtknochenmarkproben durchflusszytometrisch analysiert. Für die MikroRNA-Array-Analysen der MDS- und nicht-MDS-Proben wurden allerdings die isolierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen betrachtet, was ein neues Licht auf das mikroRNA-Profil von MDS- und nicht-MDS-Knochenmarkproben wirft.

Die Oberflächenexpressionen der MDS Knochenmarkproben weisen wie erwartet zum Teil hohe Anteile an CD34⁺ Zellen auf. Als Marker der hämatopoetischen Stammzellen und frühen Vorläuferzellen ist deren gehäuftes Vorkommen in Knochenmark und auch Peripherie bezeichnend für die Erkrankung [154], wobei es aufgrund der vielen Klassifizierungsmerkmale [82] keine einheitliche Grenze zwischen den einzelnen Risikogruppen gibt. Die Proben der nicht-MDS-Proben weisen deutlich homogenere und niedrigere CD34⁺ Zellanteile auf, was zu publizierten Daten passt, die besagen, dass in gesundem Knochenmark der Anteil CD34⁺ Zellen des gesamten Zellpools bei ca. 1,5 % liegt [155]. Auch der Anteil der CD117⁺ Zellen ist wie erwartet in den MDS-Proben deutlich erhöht, da er normalerweise bei max. 4 % liegt [156]. Die eigentlich im Knochenmark vorherrschende CD4:CD8 Ratio von 0,55 bis 1,11 liegt unter der im Blut vorkommenden CD4:CD8 Ratio von ≥ 1 [157]. Dies kann in einem Großteil der hier aufgelisteten Fälle nicht dokumentiert werden, was auf eventuelle Kontaminationen der Proben mit peripherem Blut hinweisen könnte. Es wird auch deutlich, dass die Körperspender die größte Varianz im Gehalt der CD3⁺ Zellen und deren Subgruppen CD3⁺/CD4⁺ und CD3⁺/CD8⁺ aufzeigen. Auch enthielten diese Proben die wenigsten vitalen Zellen, weshalb diese Proben nicht für Array-Analysen genutzt wurden. Auch Rafat et al. haben CD34⁺ Zellen aus verstorbenen Menschen an Tag 0 entnommen und trotz akzeptabler Vitalität der Proben, konnten sich die Zellen nicht über einen längeren Zeitraum kultivieren lassen [158]. Dies spricht dafür, dass mit Einsetzen des Todes Zersetzungsprozesse in Gang gesetzt werden,

die auch das Knochenmark betreffen. Hinzu kommt, dass den Körperspendern in dieser Arbeit frühestens 9 h oder auch sogar über 24 h nach dem Tod das Knochenmark entnommen wurde. Die Nutzung von Körperspender*innen als Quelle für Knochenmarkaspirate hat allerdings den Vorteil, dass eine Einbeziehung der MDS-Proben entsprechenden Altersgruppe in Experimenten möglich ist, da sie im hohen Alter eines natürlichen Todes gestorben sind. Die kommerziell erworbenen Proben hingegen sind von deutlich jüngeren Probanden, die freiwillig ihr Knochenmark für Forschungszwecke gespendet haben. Vorteil bei diesen Proben ist die gute Viabilität der Zellen. Außerdem sind nahezu keine Komorbiditäten zu finden, die die Zellkompartimente in ihrer Funktion beeinträchtigen könnten. Die Körperspender hingegen sind wie eben schon erwähnt eines natürlichen Todes verstorben, wobei darauf geachtet wurde, dass dieser keine hämatologischen Ursachen hatte. Nichtsdestotrotz bleibt bei diesem Weg der Knochenmarkzellbeschaffung das Restrisiko von zusätzlichen Erkrankungen, die unter Umständen eine Beeinflussung einzelner Zelltypen zur Folge hat. Aus diesem Grund wurde sich dazu entschieden, diese beiden Gruppen der Proben als nicht-MDS-Proben zu bezeichnen und nicht als gesund.

5.2.2 Identifikation von 21 signifikant unterschiedlich exprimierten mikroRNAs in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von MDS-Knochenmarkproben

Viele Arbeitsgruppen wie Pons et al., Cui et al. oder auch Merkerova et al. haben bereits mikroRNA-Profile von MDS-Proben erstellt, aber immer aus den gesamten BM-NCs oder auch PBMCs [104–106]. Ziel dieser Arbeit war es, ein zelltypspezifisches mikroRNA-Profil zu erstellen, mit dem Fokus auf den T-Zellen des Knochenmarks.

In den mikroRNA-Arrays konnten schließlich 21 signifikant unterschiedlich exprimierte mikroRNAs identifiziert werden. Da die mikroRNAs mit fortlaufender Nummerierung in *miRBase* eingetragen werden, kann davon ausgegangen werden, dass ein Großteil der hier gefundenen mikroRNAs erst sehr spät entdeckt wurden. Weiterhin wird deutlich, dass mit eben dieser aufsteigenden Nummerierung die Zahl der Papererwähnungen drastisch verringert bzw. null ist. Das wiederum bedeutet, dass diese mikroRNAs noch nahezu unbekannt und demzufolge nicht charakterisiert sind. Der Großteil der mikroRNAs ist in CD8⁺ T-Zellen herunterreguliert, was erahnen lässt, dass diese Zellen einen großen Einfluss auf Entstehung und Progress der Krankheit haben könnten. Bisherige Erkenntnisse hinsichtlich der T-Zellen in MDS beschränken sich auf Untersuchungen der peripheren T-Zellen der MDS-Patient*innen [159].

Drei der stark herunterregulierten mikroRNAs, miR-1825, miR-1281 und miR-5571, wurden schließlich ausgewählt, um detaillierter untersucht zu werden.

Mithilfe des *TargetpredictionTools miRDB*, welches über das bioinformatische Tool *MirTarget* *miRNA-Target* Interaktionen vorhersagt, konnten für miR-1281 117 potentielle miRNA-Target Interaktionen postuliert werden. Unter den ersten zehn Targets befindet sich unter anderem Erythropoetin, ein Hormon, dass die Bildung und Reifung von Erythrozyten fördert. Aber auch die Pyridoxal 5'-Phosphat Phosphatase (PDXP) ist unter den Targets zu finden. Eine Inhibierung der PDXP unterdrückt laut neuesten Forschungen die Proliferation und Effektdifferenzierung in CD8⁺ T-Zellen [160]. Im Umkehrschluss müsste eine Hochregulation der PDXP, wie unter verminderter mikroRNA-Expression angenommen werden kann, eine Hochregulation der T-Zellaktivität bedeuten. Welcher Mechanismus dahinter steckt und ob PDXP tatsächlich ein Target von miR-1281 ist, kann nur experimentell geklärt werden. Für miR-1825 konnten 573 potentielle Targets über *miRDB* identifiziert werden. Unter den ersten 10 Vorhersagen befindet sich hier zum Beispiel die *integrin subunit alpha 3* (CD49c). Es gilt als erwiesen, dass Integrine von T-Zellen exprimiert werden und sowohl an der Reifung als auch zum Beispiel bei der Migration der T-Zellen eine große Rolle spielen [161, 162]. Für miR-5571 konnte auf diesem Weg 768 miR-Target-Interaktionen identifiziert werden. Unter den ersten zehn Targets befindet sich hier zum Beispiel der *TOR signaling pathway regulator*. Der mTOR-Signalweg spielt in T-Zellen eine wichtige Rolle, damit diese angemessen auf Umwelteinflüsse, zum Beispiel eine Antigenpräsentation, reagieren können [163]. Die drei ausgewählten Kandidaten haben laut Vorhersagetool für den T-Zellstoffwechsel interessante Zielstrukturen, die aber noch experimentell validiert werden müssen.

5.2.3 Etablierung einer T-Zellkokultur mit hämatopoetischen Zelllinien

T-Zellkokulturen mit Tumorzellen sind gängige Methoden, um das Verhalten in der T-Zellen zu studieren und gleichzeitig die Reaktion der Targetzellen zu evaluieren [164]. Die in dieser Arbeit etablierte MDS-L-T-Zellkokultur bzw. THP-1-T-Zellkokultur basiert auf der allogenen Immunreaktion, bei der die Spender CD8⁺ T-Zellen die hämatopoetischen Zelllinien abtöten. Der Fokus soll hier einzig und allein auf den T-Zellen und ihrer Aktivierung liegen. Für die Gewährleistung der allogenen Reaktion, mussten im Vorfeld die HLA-Klasse-I-Profile aller beteiligten zellulären Komponenten ermittelt werden um *mismatch*-Paarungen für die Kokultur zu generieren.

Die in den hier durchgeführten Kokulturen verwendeten Spender CD8⁺ T-Zellen ließen sich, bis auf wenige, adäquat durch die artifizielle Stimulation mittels Anti-CD3 und IL-2 aktivieren und demonstrierten ein sehr hohes Proliferationsverhalten. Dies konnte sowohl makroskopisch durch die Bildung von T-Zellclustern als auch durchflusszytometrisch mittels der CFSE-Färbung bestätigt werden. Aufgrund der vielen unterschiedlichen Spendergegebenheiten, wie Alter, Geschlecht und Konstitution während der Spende, weist das Proliferationsverhalten

allerdings große Schwankungen auf. Auch wenn Wert daraufgelegt wurde, möglichst der Krankheitsinzidenz entsprechend alters- und geschlechtsidentische (> 70 Jahre, etwas mehr männlich als weiblich) Spender zu finden, gestaltete sich die Umsetzung schwierig. Da die CD8⁺ T-Zellen aus den *Buffy Coats*, den verbliebenen Leukozyten und Thrombozyten nach einer Blutspende, stammen, begrenzt dies schon das Alter der Probanden. Bis zur Änderung des Transfusionsgesetzes 2023 durften in Deutschland nur Personen unter 68 Jahren Blut spenden, wobei in der von uns gesammelten Kohorte von insgesamt 75 Spendern der Altersdurchschnitt bei 50 Jahren lag. Mit der Änderung des Transfusionsgesetzes im Jahr 2023 wurde diese Höchstaltersgrenze für eine Blut- oder Plasmaspende inzwischen abgeschafft [165].

In der Hämatologie ist es eine gängige Methode zu transfundierende Blutprodukte wie Erythrozyten-, aber auch Thrombozytenpräparate kurz einer niedrig dosierten Gammastrahlung auszusetzen. Damit kann die Proliferation von Lymphozyten unterbunden und damit das GvHD-Risiko gesenkt werden [166]. Dieser Umstand wird auch hier genutzt und die Proliferation der hämatopoetischen Zellen durch vorherige Bestrahlung mit 30 Gy blockiert. So wird ein Überwachsen der T-Zellen durch die Zelllinien über den 5-tägigen Zeitraum der Kokultur abgewendet.

Die MDS-L-Zellen vermögen nur zu einem geringen Grad die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen, selbst unter dem Einfluss von Phythämagglutinin (PHA). Dabei handelt es sich um eine mitogene Substanz, die weit verbreitet bei der Aktivierung von T-Zellen eingesetzt wird [167]. Die THP-1-Zellen besitzen ein deutlich höheres Vermögen die T-Zellen zu aktivieren, was unter dem Einsatz von PHA wiederum gesteigert werden kann. Dies demonstriert, dass die aus MDS hervorgegangen Zelllinie einen weitaus geringeren Aktivierungseinfluss auf CD8⁺ T-Zellen hat als die leukämische THP-1-Zelllinie. Für die THP-1 konnte bei einer im Institut für Anatomie und Zellbiologie angefertigten Masterarbeit eine hohe, für die MDS-L allerdings nur eine moderate MHC-I-Expression festgestellt werden. In der gleichen Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die Expression des T-Zellinhibierenden Moleküls PD-L1 in dem MDS-L-Zellen doppelt so stark wie in den THP-1-Zellen exprimiert wird [168]. Die niedrige Expression der T-Zell-stimulierenden MHC-I-Moleküle in Verbindung mit der erhöhten PD-L1-Expression könnten ein Grund dafür sein, dass MDS-L-Zellen eine weitaus schwächere Immunantwort hervorrufen. Dies wiederum belegt die Ergebnisse anderer Untersuchungen, die deutlich machen, dass Tumorzellen Mechanismen entwickeln, um sich der Immunantwort zu entziehen. Sei es durch die Expression inhibierender Moleküle [60] oder auch die Herunterregulation T-Zellaktivierender Rezeptoren wie z.B. MHC-Klasse-I-Moleküle [169]. Auch in Patientenproben von MDS-Patient*innen konnten erhöhte PD-L1-Expressionen nachgewiesen werden [170, 171].

Diese Erkenntnisse haben PD-L1 bereits als MDS-Therapietarget in den Fokus verschiedener klinischer Anti-PD-L1-Antikörper-Studien gerückt [172].

Die Aktivierung der T-Zellen bewirkt korrelierend mit dem Grad der Proliferation auch eine CD25- und CD71-Expression. Interessanter Weise steigert der Einsatz von PHA in Kokultur mit MDS-L-Zellen die CD25 Expression. Diesen Einfluss scheinen THP-1-Zellen nicht auf die CD8⁺ T-Zellen zu haben.

5.2.4 Überexpression und Zellfunktionsanalysen von miR-1281, miR-1825 und miR-5571 in primären CD8⁺ T-Zellen

Die in T-Zellen von MDS-Knochenmarkproben niedriger exprimierten mikroRNA Kandidaten miR-1281, miR-1825 und miR-5571 konnten erfolgreich in primären, peripheren Spender CD8⁺ T-Zellen überexprimiert werden (Abb.25). Allerdings weist nur miR-5571 ein halb so stark ausgeprägtes Expressionslevel wie der *Housekeeper* RNU48 auf, die anderen Kandidaten besitzen von Haus aus ein weitaus niedrigeres Expressionslevel.

Das untersuchte Proliferationsverhalten der transfizierten T-Zellen unterscheidet sich nicht von dem der nicht transfizierten Proben. Hierbei muss beachtet werden, dass die Schwankungen von zum Beispiel der Positivkontrolle zwischen 23 und 50 % proliferierter Zellen aufgrund der Heterogenität der Spender auftreten (Abb. 26). Ebenso verhält es sich mit der Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD71, die durch die Überexpression der mikroRNA-Kandidaten in ihrem Expressionsmuster nicht beeinflusst werden.

Identisches gilt für das zytotoxische Degranulationsverhalten und damit die zytotoxische Aktivität der miR-1281, miR-1825 und miR-5571 überexprimierenden CD8⁺ T-Zellen.

Auch wenn hier kein Einfluss der untersuchten mikroRNAs auf die Proliferation bzw. das CD107a-Degranulationsverhalten identifiziert werden konnte, so gibt es bereits eine Reihe publizierter Kandidaten, deren Dysregulation sich sowohl auf die Entwicklung, als auch die Effektorfunktion der T-Zellen auswirken. So kann laut Yu et al. zum Beispiel miR-491 die CD8⁺ T-Zellproliferation oder auch Apoptose regulieren [173]. Auch miR-181a kann zum Beispiel bei Überexpression die IFN γ -Ausschüttung CD8⁺ T-Zellen hemmen [174].

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die MDS stellen eine breit gefächerte Gruppe hämatologischer Stammzellerkrankungen dar, die sich zwar in den meisten Fällen erst im hohen Alter manifestieren, dadurch aber in Hinblick auf die immer älter werdende Menschheit vermehrt auftreten werden. Ihre vielseitigen Symptome und die vielschichtigen, zum Teil noch nicht vollständig aufgedeckten Ursachen machen es notwendig, neue Therapiestrategien zu entwickeln. Speziell im Hinblick auf den immunologischen Einfluss auf Entstehung und Progress, welcher bis jetzt noch weitestgehend unverstanden ist.

Der erste Teil der vorliegenden Dissertation befasst sich mit den ersten beiden Hypothesen dieser Arbeit, dass publizierte in MDS-Patient*innen differentiell exprimierte mikroRNAs bei experimenteller Überexpression in unterschiedlichen hämatopoetischen Zelllinien Aufschluss über deren Funktion bei Entstehung und Progression von MDS geben können. In den dafür durchgeführten Experimenten bezüglich des Differenzierungs- und Proliferationsverhaltens bzw. der Analyse des Zellzyklus konnte der Einfluss der Überexpression verschiedener mikroRNA-Kandidaten auf die genannten biologischen Prozesse untersucht werden. Für einige der untersuchten mikroRNAs gibt es bereits Publikationen, die ihren Einfluss auf die genannten Prozesse belegen, allerdings in anderen Zellkompartimenten. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Überexpressionen von miR-34a, miR-143 und miR-181b keinen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten sowohl der MDS-L- als auch der THP-1-Zelllinie haben. Allerdings konnte auch erstmalig der Einfluss der Überexpression von miR-15a-, miR-34a- und miR-150 auf den Zellzyklus der THP-1-Zellen identifiziert werden. Die gewonnene Erkenntnis, dass diese mikroRNAs die überexprimierenden Zellen in einen Zellzyklusarrest führen und damit deren ungehinderte Proliferation stoppen, könnte einen therapeutischen Ansatz für hämatopoetische Erkrankungen darstellen. Dafür spricht auch die proliferationshemmende Wirkung der miR-34a-Überexpression in THP-1-Zellen. Der genaue Einfluss dieser mikroRNAs und deren Targets muss nun in weiteren funktionellen Analysen und molekularbiologischen Untersuchungen abschließend geklärt werden. Die MDS-L-Zellen, als besondere Zellen mit Knochenmarksprung und MDS-Hintergrund [107], zeigen keinerlei Veränderungen nach miR-Überexpression in allen genannten Assays. Hypothese 1 betreffend konnte somit der Einfluss von miR-15a, miR-34a und miR-150 auf die biologische Aktivität der THP-1-Zellen identifiziert werden. Der in Hypothese 2 angedeutete Unterschied bei Zelldifferenzierungsexperimenten mit einer MDS- und AML-Zelllinie konnte so nicht bestätigt werden. Trotz dieser identischen Ergebnisse das Differenzierungsverhalten betreffend, liefert das unterschiedliche Verhalten der beiden Zelllinien bezüglich ihres Proliferationsverhaltens

und ihres Zellzyklus nach miR-Überexpression Hinweise, wie divers diese beiden Krankheitsbilder und die daraus resultierenden Zelllinien zu sein scheinen.

Für weiterführende Experimente könnte in Betracht gezogen werden, weitere MDS-Zelllinien mit in die Experimente einzubeziehen.

Der zweite Teil der vorliegenden Dissertation befasst sich mit den T-Zellen, als Repräsentanten der erworbenen Immunzellen in der Stammzellnische der hämatopoetischen Stammzelle. Die damit verbundene dritte Hypothese konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. So konnten hier erstmals die unterschiedlichen mikroRNA-Profile von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus MDS- und nicht-MDS-Knochenmarkproben identifiziert werden. Erste funktionelle Analysen durch Überexpression der ausgewählten Kandidaten miR-1281, miR-1825 und miR-5571 konnten allerdings keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten bzw. die zytotoxische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen aufdecken. Auch wenn dies zunächst keine signifikanten Ergebnisse hervorgebracht hat, sollten die über die *Array*-Analyse identifizierten mikroRNAs und deren putative Targets tiefergehend analysiert werden. Somit konnte die letzte Hypothese dieser Arbeit nicht bestätigt werden, wobei hier zu beachten ist, dass in dieser Arbeit nur 3 der insgesamt 21 gefundenen differentiell exprimierten mikroRNAs analysiert wurden.

V. Literaturverzeichnis

- [1] Hosono N (2019) Genetic abnormalities and pathophysiology of MDS. *Int J Clin Oncol* 24:885–892. doi: 10.1007/s10147-019-01462-6
- [2] Rotter LK, Shimony S, Ling K, Chen E, Shallis RM, Zeidan AM, Stahl M (2023) Epidemiology and Pathogenesis of Myelodysplastic Syndrome. *Cancer J* 29:111–121. doi: 10.1097/PPO.0000000000000665
- [3] Reagan MR, Rosen CJ (2016) Navigating the bone marrow niche: translational insights and cancer-driven dysfunction. *Nat Rev Rheumatol* 12:154–168. doi: 10.1038/nrrheum.2015.160
- [4] Bonomo A, Monteiro AC, Gonçalves-Silva T, Cordeiro-Spinetti E, Galvani RG, Balduino A (2016) A T Cell View of the Bone Marrow. *Front Immunol* 7:184. doi: 10.3389/fimmu.2016.00184
- [5] Mens MMJ, Ghanbari M (2018) Cell Cycle Regulation of Stem Cells by MicroRNAs. *Stem Cell Rev Rep* 14:309–322. doi: 10.1007/s12015-018-9808-y
- [6] Ma C, He D, Tian P, Wang Y, He Y, Wu Q, Jia Z, Zhang X, Zhang P, Ying H, Jin Z-B, Hu G (2022) miR-182 targeting reprograms tumor-associated macrophages and limits breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119. doi: 10.1073/pnas.2114006119
- [7] Montes P, Rusanova I, Cornejo E, García P, Guerra-Librero A, Del López MS, Haro T de, Escames G, Acuña-Castroviejo D (2024) Inflamma-miRs Profile in Myelodysplastic Syndrome Patients. *Int J Mol Sci* 25. doi: 10.3390/ijms25126784
- [8] Sokol L, Caceres G, Volinia S, Alder H, Nuovo GJ, Liu C-G, McGraw K, Clark JA, Sigua CA, Chen D-T, Moscinski L, Croce CM et al. (2011) Identification of a risk dependent microRNA expression signature in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 153:24–32. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08581.x
- [9] Singh R, Soman-Faulkner K, Sugumar K (2024) StatPearls. Embryology, Hematopoiesis. Treasure Island (FL)
- [10] Park J-E, Jardine L, Gottgens B, Teichmann SA, Haniffa M (2020) Prenatal development of human immunity. *Science* 368:600–603. doi: 10.1126/science.aaz9330
- [11] Jagannathan-Bogdan M, Zon LI (2013) Hematopoiesis. *Development* 140:2463–2467. doi: 10.1242/dev.083147
- [12] Gritz E, Hirschi KK (2016) Specification and function of hemogenic endothelium during embryogenesis. *Cell Mol Life Sci* 73:1547–1567. doi: 10.1007/s00018-016-2134-0
- [13] Nagel S (2021) NKL-Code in Normal and Aberrant Hematopoiesis. *Cancers (Basel)* 13. doi: 10.3390/cancers13081961

- [14] Risinger M, Kalfa TA (2020) Red cell membrane disorders: structure meets function. *Blood* 136:1250–1261. doi: 10.1182/blood.2019000946
- [15] Lang E, Lang F (2015) Triggers, inhibitors, mechanisms, and significance of eryptosis: the suicidal erythrocyte death. *Biomed Res Int* 2015:513518. doi: 10.1155/2015/513518
- [16] Koupenova M, Livada AC, Morrell CN (2022) Platelet and Megakaryocyte Roles in Innate and Adaptive Immunity. *Circ Res* 130:288–308. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.319821
- [17] Holinstat M (2017) Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev* 36:195–198. doi: 10.1007/s10555-017-9677-x
- [18] Da Silva EZM, Jamur MC, Oliver C (2014) Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem* 62:698–738. doi: 10.1369/0022155414545334
- [19] Shea-Donohue T, Stiltz J, Zhao A, Notari L (2010) Mast cells. *Curr Gastroenterol Rep* 12:349–357. doi: 10.1007/s11894-010-0132-1
- [20] Guilliams M, Mildner A, Yona S (2018) Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* 49:595–613. doi: 10.1016/j.immuni.2018.10.005
- [21] Hoeksema MA, Winther MP de (2016) Epigenetic Regulation of Monocyte and Macrophage Function. *Antioxidants & Redox Signaling* 25:758–774. doi: 10.1089/ars.2016.6695
- [22] Karasuyama H, Mukai K, Obata K, Tsujimura Y, Wada T (2011) Nonredundant roles of basophils in immunity. *Annu Rev Immunol* 29:45–69. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101257
- [23] Schwartz C, Eberle JU, Voehringer D (2016) Basophils in inflammation. *Eur J Pharmacol* 778:90–95. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.04.049
- [24] Gigon L, Fettelet T, Yousefi S, Simon D, Simon H-U (2023) Eosinophils from A to Z. *Allergy* 78:1810–1846. doi: 10.1111/all.15751
- [25] Liew PX, Kubes P (2019) The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol Rev* 99:1223–1248. doi: 10.1152/physrev.00012.2018
- [26] LeBien TW, Tedder TF (2008) B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112:1570–1580. doi: 10.1182/blood-2008-02-078071
- [27] Gardiner CM (2019) NK cell metabolism. *J Leukoc Biol* 105:1235–1242. doi: 10.1002/JLB.MR0718-260R
- [28] Pelletier A, Stockmann C (2022) The Metabolic Basis of ILC Plasticity. *Front Immunol* 13:858051. doi: 10.3389/fimmu.2022.858051
- [29] Orkin SH (1995) Transcription factors and hematopoietic development. *J Biol Chem* 270:4955–4958. doi: 10.1074/jbc.270.10.4955
- [30] Rasheed A (2022) Niche Regulation of Hematopoiesis: The Environment Is "Micro," but the Influence Is Large. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 42:691–699. doi: 10.1161/ATVBAHA.121.316235

- [31] Lazare SS, Wojtowicz EE, Bystrykh LV, Haan G de (2014) microRNAs in hematopoiesis. *Exp Cell Res* 329:234–238. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.08.033
- [32] Taguchi T, Mukai K (2019) Innate immunity signalling and membrane trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 59:1–7. doi: 10.1016/j.ceb.2019.02.002
- [33] Maiorino L, Daßler-Plenker J, Sun L, Egeblad M (2022) Innate Immunity and Cancer Pathophysiology. *Annu Rev Pathol* 17:425–457. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-032221-115501
- [34] Bonilla FA, Oettgen HC (2010) Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125:S33-40. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.017
- [35] (1984) Nomenclature for clusters of differentiation (CD) of antigens defined on human leukocyte populations*. *Bull World Health Organ* 62:809–815
- [36] Grzywa TM, Nowis D, Golab J (2021) The role of CD71+ erythroid cells in the regulation of the immune response. *Pharmacol Ther* 228:107927. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107927
- [37] Ren F, Sheng W-Q, Du X (2013) CD133: a cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers. *World J Gastroenterol* 19:2603–2611. doi: 10.3748/wjg.v19.i17.2603
- [38] Hinsinger G, Du Trieu De Terdonck L, Urbach S, Salvétat N, Rival M, Galoppin M, Ripoll C, Cezar R, Laurent-Chabalier S, Demattei C, Agherbi H, Castelnovo G et al. (2024) CD138 as a Specific CSF Biomarker of Multiple Sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 11:e200230. doi: 10.1212/NXI.0000000000200230
- [39] Engel P, Boumsell L, Balderas R, Bensussan A, Gattei V, Horejsi V, Jin B-Q, Malavasi F, Mortari F, Schwartz-Albiez R, Stockinger H, van Zelm MC et al. (2015) CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *J Immunol* 195:4555–4563. doi: 10.4049/jimmunol.1502033
- [40] Grimholt U (2016) MHC and Evolution in Teleosts. *Biology* 5:6. doi: 10.3390/biology5010006
- [41] Nakamura T, Shirouzu T, Nakata K, Yoshimura N, Ushigome H (2019) The Role of Major Histocompatibility Complex in Organ Transplantation- Donor Specific Anti-Major Histocompatibility Complex Antibodies Analysis Goes to the Next Stage. *Int J Mol Sci* 20. doi: 10.3390/ijms20184544
- [42] Timrott K, Beetz O, Oldhafer F, Klempnauer J, Vondran FWR, Jäger MD (2020) The importance of MHC class II in allogeneic bone marrow transplantation and chimerism-based solid organ tolerance in a rat model. *PLoS One* 15:e0233497. doi: 10.1371/journal.pone.0233497
- [43] Spellman SR (2022) Hematology 2022-what is complete HLA match in 2022? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2022:83–89. doi: 10.1182/hematology.2022000326

- [44] Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, Fernandez-Vina M, Flomenberg N, Horowitz M, Hurley CK, Noreen H, Oudshoorn M et al. (2007) High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 110:4576–4583. doi: 10.1182/blood-2007-06-097386
- [45] Nassereddine S, Rafei H, Elbahesh E, Tabbara I (2017) Acute Graft Versus Host Disease: A Comprehensive Review. *Anticancer Res* 37:1547–1555. doi: 10.21873/anticancer.11483
- [46] Malard F, Holler E, Sandmaier BM, Huang H, Mohty M (2023) Acute graft-versus-host disease. *Nat Rev Dis Primers* 9:27. doi: 10.1038/s41572-023-00438-1
- [47] Kanda J, Brazauskas R, Hu Z-H, Kuwatsuka Y, Nagafuji K, Kanamori H, Kanda Y, Miyamura K, Murata M, Fukuda T, Sakamaki H, Kimura F et al. (2016) Graft-versus-Host Disease after HLA-Matched Sibling Bone Marrow or Peripheral Blood Stem Cell Transplantation: Comparison of North American Caucasian and Japanese Populations. *Biol Blood Marrow Transplant* 22:744–751. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.12.027
- [48] Carapito R, Jung N, Kwemou M, Untrau M, Michel S, Pichot A, Giacometti G, Macquin C, Ilias W, Morlon A, Kotova I, Apostolova P et al. (2016) Matching for the nonconventional MHC-I MICA gene significantly reduces the incidence of acute and chronic GVHD. *Blood* 128:1979–1986. doi: 10.1182/blood-2016-05-719070
- [49] Rojo JM, Bello R, Portolés P (2008) T-cell receptor. *Adv Exp Med Biol* 640:1–11. doi: 10.1007/978-0-387-09789-3_1
- [50] Thapa P, Farber DL (2019) The Role of the Thymus in the Immune Response. *Thorac Surg Clin* 29:123–131. doi: 10.1016/j.thorsurg.2018.12.001
- [51] Banerjee S, Chapman SJ (2018) Influence of correlated antigen presentation on T-cell negative selection in the thymus. *J R Soc Interface* 15. doi: 10.1098/rsif.2018.0311
- [52] Sauce D, Appay V (2011) Altered thymic activity in early life: how does it affect the immune system in young adults? *Curr Opin Immunol* 23:543–548. doi: 10.1016/j.coi.2011.05.001
- [53] Makau MC, Powell J, Prendergast J, Latré de Laté P, Morrison LJ, Fisch A, Gathura P, Kitale P, Connelley T, Toye P (2020) Inverted CD4+/CD8+ T cell ratio in Boran (*Bos indicus*) cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 230:110126. doi: 10.1016/j.vetimm.2020.110126
- [54] Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B (2012) CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol* 2012:925135. doi: 10.1155/2012/925135
- [55] Golubovskaya V, Wu L (2016) Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 8. doi: 10.3390/cancers8030036

- [56] Karki S, Umar S, Kasi A (2020) Treating Colorectal Cancer with Immunotherapy: Implications for Single versus Combination Therapy. *Curr Colorectal Cancer Rep* 16:107–117. doi: 10.1007/s11888-020-00459-y
- [57] St Paul M, Ohashi PS (2020) The Roles of CD8+ T Cell Subsets in Antitumor Immunity. *Trends Cell Biol* 30:695–704. doi: 10.1016/j.tcb.2020.06.003
- [58] Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ (2007) Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 27:111–122. doi: 10.1016/j.immuni.2007.05.016
- [59] Naimi A, Mohammed RN, Raji A, Chupradit S, Yumashev AV, Suksatan W, Shalaby MN, Thangavelu L, Kamrava S, Shomali N, Sohrabi AD, Adili A et al. (2022) Tumor immunotherapies by immune checkpoint inhibitors (ICIs); the pros and cons. *Cell Commun Signal* 20:44. doi: 10.1186/s12964-022-00854-y
- [60] Mo Z, Liu J, Zhang Q, Chen Z, Mei J, Liu L, Yang S, Li H, Zhou L, You Z (2016) Expression of PD-1, PD-L1 and PD-L2 is associated with differentiation status and histological type of endometrial cancer. *Oncol Lett* 12:944–950. doi: 10.3892/ol.2016.4744
- [61] Ott PA, Hodi FS, Robert C (2013) CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 19:5300–5309. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0143
- [62] Tanvetyanon T, Gray JE, Antonia SJ (2017) PD-1 checkpoint blockade alone or combined PD-1 and CTLA-4 blockade as immunotherapy for lung cancer? *Expert Opin Biol Ther* 17:305–312. doi: 10.1080/14712598.2017.1280454
- [63] Prokhnevskaya N, Cardenas MA, Valanparambil RM, Sobierajska E, Barwick BG, Jansen C, Reyes Moon A, Gregorova P, delBalzo L, Greenwald R, Bilen MA, Alemozaffar M et al. (2023) CD8+ T cell activation in cancer comprises an initial activation phase in lymph nodes followed by effector differentiation within the tumor. *Immunity* 56:107–124.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2022.12.002
- [64] Niederlova V, Tsyklauri O, Kovar M, Stepanek O (2023) IL-2-driven CD8+ T cell phenotypes: implications for immunotherapy. *Trends Immunol* 44:890–901. doi: 10.1016/j.it.2023.09.003
- [65] Reina-Campos M, Scharping NE, Goldrath AW (2021) CD8+ T cell metabolism in infection and cancer. *Nat Rev Immunol* 21:718–738. doi: 10.1038/s41577-021-00537-8
- [66] Shi Z, Du Q, Wang X, Wang J, Chen H, Lang Y, Kong L, Luo W, Yang M, Zhou H (2022) Granzyme B in circulating CD8+ T cells as a biomarker of immunotherapy effectiveness and disability in neuromyelitis optica spectrum disorders. *Front Immunol* 13:1027158. doi: 10.3389/fimmu.2022.1027158

- [67] Johnson HL, Willenbring RC, Jin F, Manhart WA, LaFrance SJ, Pirko I, Johnson AJ (2014) Perforin competent CD8 T cells are sufficient to cause immune-mediated blood-brain barrier disruption. *PLoS One* 9:e111401. doi: 10.1371/journal.pone.0111401
- [68] Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA (2015) Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol* 15:388–400. doi: 10.1038/nri3839
- [69] Dobrzanski MJ, Reome JB, Hollenbaugh JA, Dutton RW (2004) Tc1 and Tc2 effector cell therapy elicit long-term tumor immunity by contrasting mechanisms that result in complementary endogenous type 1 antitumor responses. *J Immunol* 172:1380–1390. doi: 10.4049/jimmunol.172.3.1380
- [70] Lu Y, Wang Q, Yi Q (2014) Anticancer Tc9 cells: Long-lived tumor-killing T cells for adoptive therapy. *Oncoimmunology* 3:e28542. doi: 10.4161/onci.28542
- [71] Mittrücker H-W, Visekruna A, Huber M (2014) Heterogeneity in the differentiation and function of CD8⁺ T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 62:449–458. doi: 10.1007/s00005-014-0293-y
- [72] Klein Geltink RI, Pillai A (2022) Executive CoAching unleashes Tc22 anti-tumor capacity. *Sci Immunol* 7:eabn9190. doi: 10.1126/sciimmunol.abn9190
- [73] Létourneau S, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O (2009) IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol* 123:758–762. doi: 10.1016/j.jaci.2009.02.011
- [74] Kalia V, Sarkar S (2018) Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation by IL-2-A Balancing Act. *Front Immunol* 9:2987. doi: 10.3389/fimmu.2018.02987
- [75] Motamedi M, Xu L, Elahi S (2016) Correlation of transferrin receptor (CD71) with Ki67 expression on stimulated human and mouse T cells: The kinetics of expression of T cell activation markers. *J Immunol Methods* 437:43–52. doi: 10.1016/j.jim.2016.08.002
- [76] Calvi LM, Li AJ, Becker MW (2019) What is the role of the microenvironment in MDS? *Best Pract Res Clin Haematol* 32:101113. doi: 10.1016/j.beha.2019.101113
- [77] Kontro S, Raitanen J, Porkka K, Auvinen A (2022) Incidence of myelodysplastic syndromes in Finland 1997-2016. *Leuk Res* 116:106839. doi: 10.1016/j.leukres.2022.106839
- [78] Germing U, Aul C, Niemeyer CM, Haas R, Bennett JM (2008) Epidemiology, classification and prognosis of adults and children with myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 87:691–699. doi: 10.1007/s00277-008-0499-3
- [79] Ma X, Does M, Raza A, Mayne ST (2007) Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States. *Cancer* 109:1536–1542. doi: 10.1002/cncr.22570
- [80] Karlic H, Herrmann H, Varga F, Thaler R, Reitermaier R, Spitzer S, Ghanim V, Blatt K, Sperr WR, Valent P, Pfeilstöcker M (2014) The role of epigenetics in the regulation of

- apoptosis in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 90:1–16. doi: 10.1016/j.critrevonc.2013.10.003
- [81] Scott BL, Deeg HJ (2010) Myelodysplastic syndromes. *Annu Rev Med* 61:345–358. doi: 10.1146/annurev.med.051308.132852
- [82] Khoury JD, Solary E, Abela O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, Bejar R, Berti E, Busque L, Chan JKC, Chen W, Chen X et al. (2022) The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 36:1703–1719. doi: 10.1038/s41375-022-01613-1
- [83] Malcovati L, Stevenson K, Papaemmanuil E, Neuberg D, Bejar R, Boulton J, Bowen DT, Campbell PJ, Ebert BL, Fenaux P, Haferlach T, Heuser M et al. (2020) SF3B1-mutant MDS as a distinct disease subtype: a proposal from the International Working Group for the Prognosis of MDS. *Blood* 136:157–170. doi: 10.1182/blood.2020004850
- [84] Zawacka JE (2024) p53 biology and reactivation for improved therapy in MDS and AML. *Biomark Res* 12:34. doi: 10.1186/s40364-024-00579-9
- [85] Zhu Y-J, Ma X-Y, Hao Y-L, Guan Y (2021) Myelodysplastic syndrome transformed into B-lineage acute lymphoblastic leukemia: A case report. *World J Clin Cases* 9:5191–5196. doi: 10.12998/wjcc.v9.i19.5191
- [86] Guo Z-P, Tan Y-H, Li J-L, Xu Z-F, Chen X-H, Xu L-R (2018) Acute pro-B-Cell lymphoblastic leukemia transformed from myelodysplastic syndrome with an ASXL1 missense mutation: A case report with literature review. *Oncol Lett* 15:9745–9750. doi: 10.3892/ol.2018.8546
- [87] Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, Bennett JM, Bowen D, Fenaux P, Dreyfus F, Kantarjian H, Kuendgen A et al. (2012) Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 120:2454–2465. doi: 10.1182/blood-2012-03-420489
- [88] Garcia-Manero G (2023) Myelodysplastic syndromes: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 98:1307–1325. doi: 10.1002/ajh.26984
- [89] Bazinet A, Bravo GM (2022) New Approaches to Myelodysplastic Syndrome Treatment. *Curr Treat Options Oncol* 23:668–687. doi: 10.1007/s11864-022-00965-1
- [90] Platzbecker U (2019) Treatment of MDS. *Blood* 133:1096–1107. doi: 10.1182/blood-2018-10-844696
- [91] Vittayawacharin P, Kongtim P, Ciurea SO (2023) Allogeneic stem cell transplantation for patients with myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol* 98:322–337. doi: 10.1002/ajh.26763
- [92] Prem S, Atenafu EG, Lam W, Law A, Michelis FV, Kim D, Viswabandya A, Howard Lipton J, Mattsson J, Kumar R (2020) Allogeneic stem cell transplant in myelodysplastic

- syndrome-factors impacting survival. *Eur J Haematol* 104:116–124. doi: 10.1111/ejh.13353
- [93] Arnaout K, Patel N, Jain M, El-Amm J, Amro F, Tabbara IA (2014) Complications of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Invest* 32:349–362. doi: 10.3109/07357907.2014.919301
- [94] Huang W, Wu X, Xiang S, Qiao M, Li H, Zhu Y, Zhu Z, Zhao Z (2022) Regulatory of miRNAs in tri-lineage differentiation of C3H10T1/2. *Stem Cell Res Ther* 13:521. doi: 10.1186/s13287-022-03205-3
- [95] Yoshida T, Asano Y, Ui-Tei K (2021) Modulation of MicroRNA Processing by Dicer via Its Associated dsRNA Binding Proteins. *Noncoding RNA* 7. doi: 10.3390/ncrna7030057
- [96] Oliveto S, Mancino M, Manfrini N, Biffo S (2017) Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World J Biol Chem* 8:45–56. doi: 10.4331/wjbc.v8.i1.45
- [97] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843–854. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-y
- [98] Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S (2019) miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res* 47:D155-D162. doi: 10.1093/nar/gky1141
- [99] Medley JC, Panzade G, Zinovyeva AY (2021) microRNA strand selection: Unwinding the rules. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 12:e1627. doi: 10.1002/wrna.1627
- [100] Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkland SJ, Newman J, Bronson RT, Crowley D, Stone JR, Jaenisch R, Sharp PA et al. (2008) Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 132:875–886. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.019
- [101] Rasmussen KD, Simmini S, Abreu-Goodger C, Bartonicek N, Di Giacomo M, Bilbao-Cortes D, Horos R, Lindern M von, Enright AJ, O'Carroll D (2010) The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis. *J Exp Med* 207:1351–1358. doi: 10.1084/jem.20100458
- [102] Heng J, Wu D, Lu S, Zhao Y (2020) miR-106a Targets Anoctamin 1 (ANO1) to Regulate Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammatory Response in Macrophages. *Med Sci Monit* 26:e922479. doi: 10.12659/MSM.922479
- [103] Razzak R, Bédard ELR, Kim JO, Gazala S, Guo L, Ghosh S, Joy A, Nijjar T, Wong E, Roa WH (2016) MicroRNA expression profiling of sputum for the detection of early and locally advanced non-small-cell lung cancer: a prospective case-control study. *Curr Oncol* 23:e86-94. doi: 10.3747/co.23.2830
- [104] Pons A, Nomdedeu B, Navarro A, Gaya A, Gel B, Diaz T, Valera S, Rozman M, Belkaid M, Montserrat E, Monzo M (2009) Hematopoiesis-related microRNA expression in

- p>myelodysplastic syndromes.
- Leuk Lymphoma*
- 50:1854–1859. doi: 10.3109/10428190903147645
- [105] Cui J, Wei C, Deng L, Kuang X, Zhang Z, Pierides C, Chi J, Wang L (2018) MicroRNA-143 increases cell apoptosis in myelodysplastic syndrome through the Fas/FasL pathway both in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 53:2191–2199. doi: 10.3892/ijo.2018.4534
- [106] Dostalova Merkerova M, Hrustincova A, Krejcik Z, Votavova H, Ratajova E, Cermak J, Belickova M (2017) Microarray profiling defines circulating microRNAs associated with myelodysplastic syndromes. *Neoplasma* 64:571–578. doi: 10.4149/neo_2017_411
- [107] Drexler HG, Dirks WG, Macleod RAF (2009) Many are called MDS cell lines: one is chosen. *Leuk Res* 33:1011–1016. doi: 10.1016/j.leukres.2009.03.005
- [108] Hölken JM, Teusch N (2023) The Monocytic Cell Line THP-1 as a Validated and Robust Surrogate Model for Human Dendritic Cells. *Int J Mol Sci* 24. doi: 10.3390/ijms24021452
- [109] Cho H-Y, Choi E-K, Lee S-W, Kim K-H, Park S-J, Lee CK, Lee S-W (2011) All-trans retinoic acid induces TLR-5 expression and cell differentiation and promotes flagellin-mediated cell functions in human THP-1 cells. *Immunol Lett* 136:97–107. doi: 10.1016/j.imlet.2011.01.001
- [110] Kim Y, Kim HS, Sohn J, Ji JD (2019) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces human myeloid cell differentiation via the mTOR signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 519:909–915. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.09.100
- [111] Chen P-Y, Yen J-H, Kao R-H, Chen J-H (2013) Down-regulation of the oncogene PTTG1 via the KLF6 tumor suppressor during induction of myeloid differentiation. *PLoS One* 8:e71282. doi: 10.1371/journal.pone.0071282
- [112] Tao Y-F, Wang N-N, Xu L-X, Li Z-H, Li X-L, Xu Y-Y, Fang F, Li M, Qian G-H, Li Y-H, Li Y-P, Wu Y et al. (2017) Molecular mechanism of G1 arrest and cellular senescence induced by LEE011, a novel CDK4/CDK6 inhibitor, in leukemia cells. *Cancer Cell Int* 17:35. doi: 10.1186/s12935-017-0405-y
- [113] Peng J, Fu B, Fu G, Zhao X, Li X, Chen F (2017) Effect of NPM1 type B mutation on the proliferation, invasion and chemosensitivity of THP-1 leukemia cells. *Pharmazie* 72:608–613. doi: 10.1691/ph.2017.7473
- [114] Yang W, Yang X, Zhang Y, Li Y, Lv W (2023) MiR-363 restrain the proliferation, migration and invasion of colorectal carcinoma cell by targeting E2F3. *J Cancer* 14:1362–1370. doi: 10.7150/jca.83897
- [115] Crowley LC, Chojnowski G, Waterhouse NJ (2016) Measuring the DNA Content of Cells in Apoptosis and at Different Cell-Cycle Stages by Propidium Iodide Staining and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc* 2016. doi: 10.1101/pdb.prot087247

- [116] Cude K, Wang Y, Choi H-J, Hsuan S-L, Zhang H, Wang C-Y, Xia Z (2007) Regulation of the G2-M cell cycle progression by the ERK5-NFkappaB signaling pathway. *J Cell Biol* 177:253–264. doi: 10.1083/jcb.200609166
- [117] Cossarizza A, Chang H-D, Radbruch A, Acs A, Adam D, Adam-Klages S, Agace WW, Aghaeepour N, Akdis M, Allez M, Almeida LN, Alvisi G et al. (2019) Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur J Immunol* 49:1457–1973. doi: 10.1002/eji.201970107
- [118] Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G, Deniz G (2009) Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol* 254:149–154. doi: 10.1016/j.cellimm.2008.08.007
- [119] Li W, Cao L, Li M, Yang X, Zhang W, Song Z, Wang X, Zhang L, Morahan G, Qin C, Gao R (2021) Novel spontaneous myelodysplastic syndrome mouse model. *Animal Model Exp Med* 4:169–180. doi: 10.1002/ame2.12168
- [120] Altrock E, Sens-Albert C, Hofmann F, Riabov V, Schmitt N, Xu Q, Jann J-C, Rapp F, Steiner L, Streuer A, Nowak V, Obländer J et al. (2023) Significant improvement of bone marrow-derived MSC expansion from MDS patients by defined xeno-free medium. *Stem Cell Res Ther* 14:156. doi: 10.1186/s13287-023-03386-5
- [121] Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ (2014) THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol* 23:37–45. doi: 10.1016/j.intimp.2014.08.002
- [122] Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MKB, Dockrell DH (2010) The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 5:e8668. doi: 10.1371/journal.pone.0008668
- [123] Gopinath VK, Soumya S, Mohammad MG (2021) Ror β expression in activated macrophages and dental pulp stem cells. *Int Endod J* 54:388–398. doi: 10.1111/iej.13431
- [124] Voisine C, Mastelic B, Sponaas A-M, Langhorne J (2010) Classical CD11c+ dendritic cells, not plasmacytoid dendritic cells, induce T cell responses to *Plasmodium chabaudi* malaria. *Int J Parasitol* 40:711–719. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.11.005
- [125] Sharygin D, Koniaris LG, Wells C, Zimmers TA, Hamidi T (2023) Role of CD14 in human disease. *Immunology* 169:260–270. doi: 10.1111/imm.13634
- [126] Dutertre C-A, Becht E, Irac SE, Khalilnezhad A, Narang V, Khalilnezhad S, Ng PY, van den Hoogen LL, Leong JY, Lee B, Chevrier M, Zhang XM et al. (2019) Single-Cell Analysis of Human Mononuclear Phagocytes Reveals Subset-Defining Markers and Identifies Circulating Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity* 51:573-589.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2019.08.008

- [127] Liu T, Huang T, Li J, Li A, Li C, Huang X, Li D, Wang S, Liang M (2023) Optimization of differentiation and transcriptomic profile of THP-1 cells into macrophage by PMA. *PLoS One* 18:e0286056. doi: 10.1371/journal.pone.0286056
- [128] Ben-David U, Siranosian B, Ha G, Tang H, Oren Y, Hinohara K, Strathdee CA, Dempster J, Lyons NJ, Burns R, Nag A, Kugener G et al. (2018) Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature* 560:325–330. doi: 10.1038/s41586-018-0409-3
- [129] Hmama Z, Nandan D, Sly L, Knutson KL, Herrera-Velit P, Reiner NE (1999) 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3)-induced myeloid cell differentiation is regulated by a vitamin D receptor-phosphatidylinositol 3-kinase signaling complex. *J Exp Med* 190:1583–1594. doi: 10.1084/jem.190.11.1583
- [130] Miranda MB, McGuire TF, Johnson DE (2002) Importance of MEK-1/-2 signaling in monocytic and granulocytic differentiation of myeloid cell lines. *Leukemia* 16:683–692. doi: 10.1038/sj.leu.2402400
- [131] Saito S, Ohno S-I, Harada Y, Kanno Y, Kuroda M (2023) MiR-34a induces myofibroblast differentiation from renal fibroblasts. *Clin Exp Nephrol* 27:411–418. doi: 10.1007/s10157-023-02329-x
- [132] Song J, Lee M, Kim D, Han J, Chun C-H, Jin E-J (2013) MicroRNA-181b regulates articular chondrocytes differentiation and cartilage integrity. *Biochem Biophys Res Commun* 431:210–214. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.133
- [133] Di Marco M, Veschi S, Lanuti P, Ramassone A, Pacillo S, Pagotto S, Pepe F, George-William JN, Curcio C, Marchisio M, Miscia S, Innocenti I et al. (2021) Enhanced Expression of miR-181b in B Cells of CLL Improves the Anti-Tumor Cytotoxic T Cell Response. *Cancers (Basel)* 13. doi: 10.3390/cancers13020257
- [134] Engkvist ME, Stratford EW, Lorenz S, Meza-Zepeda LA, Myklebost O, Munthe E (2017) Analysis of the miR-34 family functions in breast cancer reveals annotation error of miR-34b. *Sci Rep* 7:9655. doi: 10.1038/s41598-017-10189-1
- [135] Yong H, Fu J, Gao G, Shi H, Zheng D, Zhou X (2020) MiR-34a suppresses the proliferation and invasion of gastric cancer by modulating PDL1 in the immune microenvironment. *Mol Cell Probes* 53:101601. doi: 10.1016/j.mcp.2020.101601
- [136] Yin M, Zhang Z, Wang Y (2023) Anti-tumor effects of miR-34a by regulating immune cells in the tumor microenvironment. *Cancer Med* 12:11602–11610. doi: 10.1002/cam4.5826
- [137] Ding N, Wu H, Tao T, Peng E (2017) NEAT1 regulates cell proliferation and apoptosis of ovarian cancer by miR-34a-5p/BCL2. *Onco Targets Ther* 10:4905–4915. doi: 10.2147/OTT.S142446

- [138] Wang X, Liu P, Zhu H, Xu Y, Ma C, Dai X, Huang L, Liu Y, Zhang L, Qin C (2009) miR-34a, a microRNA up-regulated in a double transgenic mouse model of Alzheimer's disease, inhibits bcl2 translation. *Brain Res Bull* 80:268–273. doi: 10.1016/j.brainresbull.2009.08.006
- [139] Blum S, Tsilimidos G, Bresser H, Lübbert M (2023) Role of Bcl-2 inhibition in myelodysplastic syndromes. *Int J Cancer* 152:1526–1535. doi: 10.1002/ijc.34377
- [140] Nabipoorashrafi SA, Shomali N, Sadat-Hatamnezhad L, Mahami-Oskouei M, Mahmoudi J, Sandoghchian Shotorbani B, Akbari M, Xu H, Sandoghchian Shotorbani S (2020) miR-143 acts as an inhibitor of migration and proliferation as well as an inducer of apoptosis in melanoma cancer cells in vitro. *IUBMB Life* 72:2034–2044. doi: 10.1002/iub.2345
- [141] Yang X, Sun Y, Zhang Y, Han S (2020) Downregulation of miR-181b inhibits human colon cancer cell proliferation by targeting CYLD and inhibiting the NF- κ B signaling pathway. *Int J Mol Med* 46:1755–1764. doi: 10.3892/ijmm.2020.4720
- [142] Gažová I, Lefevre L, Bush SJ, Clohisey S, Arner E, Hoon M de, Severin J, van Duin L, Andersson R, Lengeling A, Hume DA, Summers KM (2020) The Transcriptional Network That Controls Growth Arrest and Macrophage Differentiation in the Human Myeloid Leukemia Cell Line THP-1. *Front Cell Dev Biol* 8:498. doi: 10.3389/fcell.2020.00498
- [143] Tsujioka T, Yokoi A, Uesugi M, Kishimoto M, Tochigi A, Suemori S, Tohyama Y, Tohyama K (2013) Effects of DNA methyltransferase inhibitors (DNMTIs) on MDS-derived cell lines. *Exp Hematol* 41:189–197. doi: 10.1016/j.exphem.2012.10.006.
- [144] Herrera R, Hubbell S, Decker S, Petruzzelli L (1998) A role for the MEK/MAPK pathway in PMA-induced cell cycle arrest: modulation of megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Exp Cell Res* 238:407–414. doi: 10.1006/excr.1997.3847
- [145] Feng J, Lu S, Ou B, Liu Q, Dai J, Ji C, Zhou H, Huang H, Ma Y (2020) The Role of JNk Signaling Pathway in Obesity-Driven Insulin Resistance. *Diabetes Metab Syndr Obes* 13:1399–1406. doi: 10.2147/DMSO.S236127
- [146] Joyce D, Albanese C, Steer J, Fu M, Bouzahzah B, Pestell RG (2001) NF-kappaB and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine Growth Factor Rev* 12:73–90. doi: 10.1016/S1359-6101(00)00018-6
- [147] Navarro F, Gutman D, Meire E, Cáceres M, Rigoutsos I, Bentwich Z, Lieberman J (2009) miR-34a contributes to megakaryocytic differentiation of K562 cells independently of p53. *Blood* 114:2181–2192. doi: 10.1182/blood-2009-02-205062
- [148] Wang B, Li D, Kovalchuk I, Apel IJ, Chinnaiyan AM, Wóycicki RK, Cantor CR, Kovalchuk O (2018) miR-34a directly targets tRNAiMet precursors and affects cellular proliferation, cell cycle, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:7392–7397. doi: 10.1073/pnas.1703029115

- [149] Zhao H, Kalota A, Jin S, Gewirtz AM (2009) The c-myb proto-oncogene and microRNA-15a comprise an active autoregulatory feedback loop in human hematopoietic cells. *Blood* 113:505–516. doi: 10.1182/blood-2008-01-136218
- [150] Luo Q, Li X, Li J, Kong X, Zhang J, Chen L, Huang Y, Fang L (2013) MiR-15a is underexpressed and inhibits the cell cycle by targeting CCNE1 in breast cancer. *Int J Oncol* 43:1212–1218. doi: 10.3892/ijo.2013.2034
- [151] Sun Z, Wang Y, Han X, Zhao X, Peng Y, Li Y, Peng M, Song J, Wu K, Sun S, Zhou W, Qi B et al. (2015) miR-150 inhibits terminal erythroid proliferation and differentiation. *Oncotarget* 6:43033–43047. doi: 10.18632/oncotarget.5824
- [152] Di Rosa F, Gebhardt T (2016) Bone Marrow T Cells and the Integrated Functions of Recirculating and Tissue-Resident Memory T Cells. *Front Immunol* 7:51. doi: 10.3389/fimmu.2016.00051
- [153] Kanter-Lewensohn L, Hellström-Lindberg E, Kock Y, Elmhorn-Rosenborg A, Ost A (1996) Analysis of CD34-positive cells in bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia and in normal individuals: a comparison between FACS analysis and immunohistochemistry. *Eur J Haematol* 56:124–129. doi: 10.1111/j.1600-0609.1996.tb01330.x.
- [154] Span LF, Dar SE, Shetty V, Mundle SD, Broady-Robinson L, Alvi S, Raymakers RA, Witte T de, Raza A (1998) Apparent expansion of CD34+ cells during the evolution of myelodysplastic syndromes to acute myeloid leukemia. *Leukemia* 12:1685–1695. doi: 10.1038/sj.leu.2401149
- [155] Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS (1996) CD34: structure, biology, and clinical utility [see comments]. *Blood* 87:1–13. doi: 10.1182/blood.V87.1.1.1
- [156] Wells SJ, Bray RA, Stempora LL, Farhi DC (1996) CD117/CD34 expression in leukemic blasts. *Am J Clin Pathol* 106:192–195. doi: 10.1093/ajcp/106.2.192
- [157] Adkins BD, Jaeger NR, Whitehair RM, Pramoonjago P, Aguilera NS (2021) Characterization of bone marrow CD4 to CD8 ratios and lymphocyte composition in adults by image analysis. *J Hematopathol* 14:291–298. doi: 10.1007/s12308-021-00472-6
- [158] Rafat A, Dizaji Asl K, Mazloumi Z, Samadirad B, Ashrafiyanbonab F, Farahzadi R, Nozad Charoudeh H (2022) Bone marrow CD34 positive cells may be suitable for collection after death. *Transfus Apher Sci* 61:103452. doi: 10.1016/j.transci.2022.103452
- [159] Xia A, Zhang Y, Xu J, Yin T, Lu X-J (2019) T Cell Dysfunction in Cancer Immunity and Immunotherapy. *Front Immunol* 10:1719. doi: 10.3389/fimmu.2019.01719
- [160] Bargiela D, Cunha PP, Veliça P, Foskolou IP, Barbieri L, Rundqvist H, Johnson RS (2022) Vitamin B6 Metabolism Determines T Cell Anti-Tumor Responses. *Front Immunol* 13:837669. doi: 10.3389/fimmu.2022.837669

- [161] Sawada M, Nagamine J, Takeda K, Utsumi K, Kosugi A, Tatsumi Y, Hamaoka T, Miyake K, Nakajima K, Watanabe T (1992) Expression of VLA-4 on thymocytes. Maturation stage-associated transition and its correlation with their capacity to adhere to thymic stromal cells. *J Immunol* 149:3517–3524
- [162] Stanley P, Tooze S, Hogg N (2012) A role for Rap2 in recycling the extended conformation of LFA-1 during T cell migration. *Biol Open* 1:1161–1168. doi: 10.1242/bio.20122824
- [163] Chi H (2012) Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *Nat Rev Immunol* 12:325–338. doi: 10.1038/nri3198
- [164] Cattaneo CM, Dijkstra KK, Fanchi LF, Kelderman S, Kaing S, van Rooij N, van den Brink S, Schumacher TN, Voest EE (2020) Tumor organoid-T-cell coculture systems 15:15–39. doi: 10.1038/s41596-019-0232-9
- [165] Gesetz zur Regelung des Transfusionswesens (Transfusionsgesetz - TFG) (11.02.2023) (Zugriff vom 15.11.2024, 10:41 Uhr). <https://www.gesetze-im-internet.de/tfg/BJNR175200998.html>
- [166] Kleinman S, Stassinopoulos A (2018) Transfusion-associated graft-versus-host disease reexamined: potential for improved prevention using a universally applied intervention. *Transfusion* 58:2545–2563. doi: 10.1111/trf.14930
- [167] Trickett A, Kwan YL (2003) T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J Immunol Methods* 275:251–255. doi: 10.1016/S0022-1759(03)00010-3
- [168] Putri Mandasari MicroRNA controlled cytokine-induced immune regulation in hematological diseases. Masterarbeit 2018
- [169] Li X, Guo X, Huang J, Lin Q, Qin B, Jiang M, Shan X, Luo Z, Zhang J, Shi Y, Lu Y, Liu X et al. (2023) Recruiting T cells and sensitizing tumors to NKG2D immune surveillance for robust antitumor immune response. *J Control Release* 353:943–955. doi: 10.1016/j.jconrel.2022.12.032
- [170] Cheng P, Eksioglu EA, Chen X, Kandell W, Le Trinh T, Cen L, Qi J, Sallman DA, Zhang Y, Tu N, Adams WA, Zhang C et al. (2019) S100A9-induced overexpression of PD-1/PD-L1 contributes to ineffective hematopoiesis in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 33:2034–2046. doi: 10.1038/s41375-019-0397-9
- [171] Kondo A, Yamashita T, Tamura H, Zhao W, Tsuji T, Shimizu M, Shinya E, Takahashi H, Tamada K, Chen L, Dan K, Ogata K (2010) Interferon-gamma and tumor necrosis factor- α induce an immunoinhibitory molecule, B7-H1, via nuclear factor- κ B activation in blasts in myelodysplastic syndromes. *Blood* 116:1124–1131. doi: 10.1182/blood-2009-12-255125
- [172] Chien KS, Kim K, Nogueras-Gonzalez GM, Borthakur G, Naqvi K, Daver NG, Montalban-Bravo G, Cortes JE, DiNardo CD, Jabbour E, Alvarado Y, Andreeff M et al. (2021) Phase

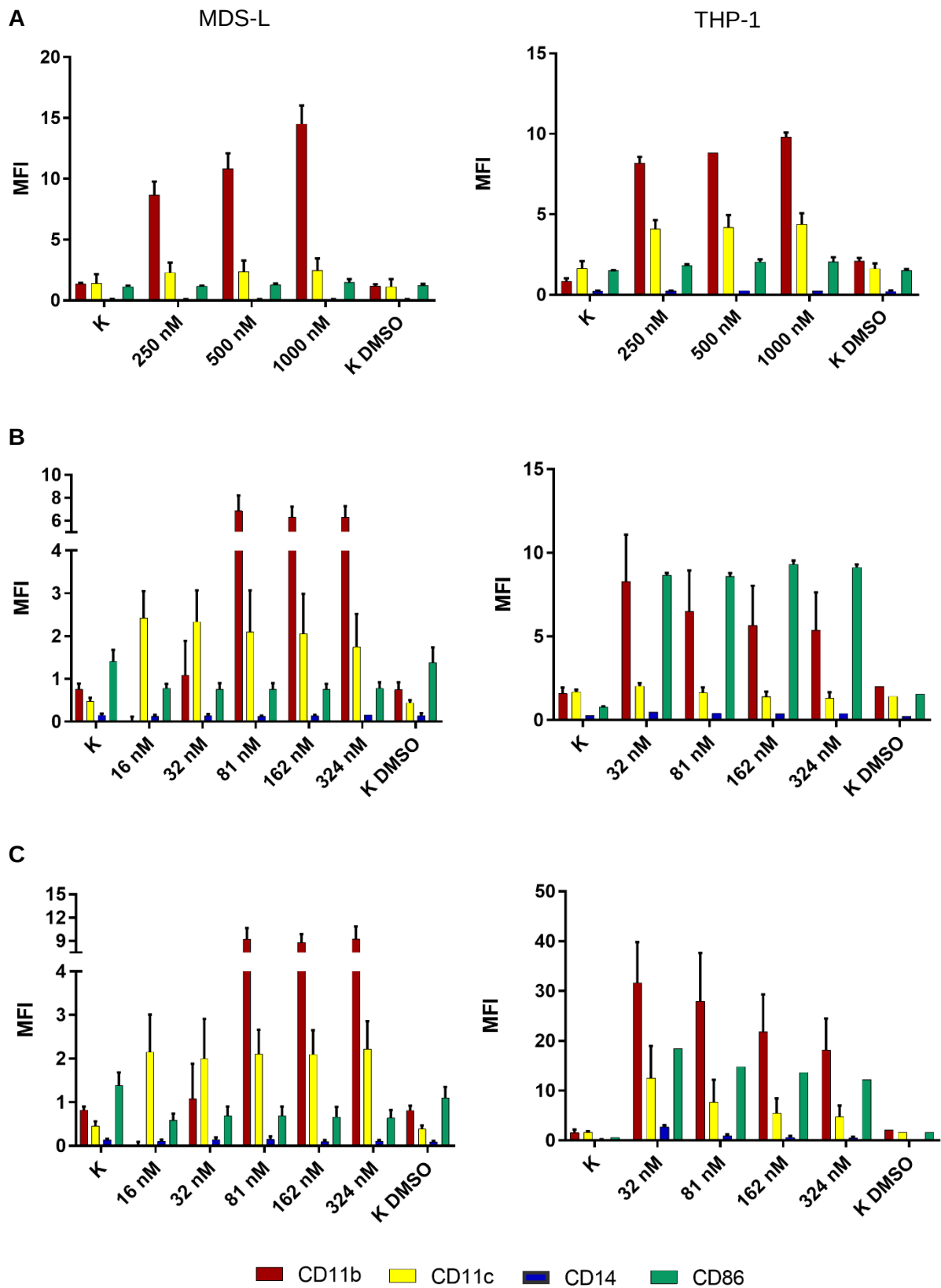
- II study of azacitidine with pembrolizumab in patients with intermediate-1 or higher-risk myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 195:378–387. doi: 10.1111/bjh.17689
- [173] Yu T, Zuo Q-F, Gong L, Wang L-N, Zou Q-M, Xiao B (2016) MicroRNA-491 regulates the proliferation and apoptosis of CD8(+) T cells. *Sci Rep* 6:30923. doi: 10.1038/srep30923
- [174] Amado T, Amorim A, Enguita FJ, Romero PV, Inácio D, Miranda MP de, Winter SJ, Simas JP, Krueger A, Schmolka N, Silva-Santos B, Gomes AQ (2020) MicroRNA-181a regulates IFN- γ expression in effector CD8+ T cell differentiation. *J Mol Med (Berl)* 98:309–320. doi: 10.1007/s00109-019-01865-y

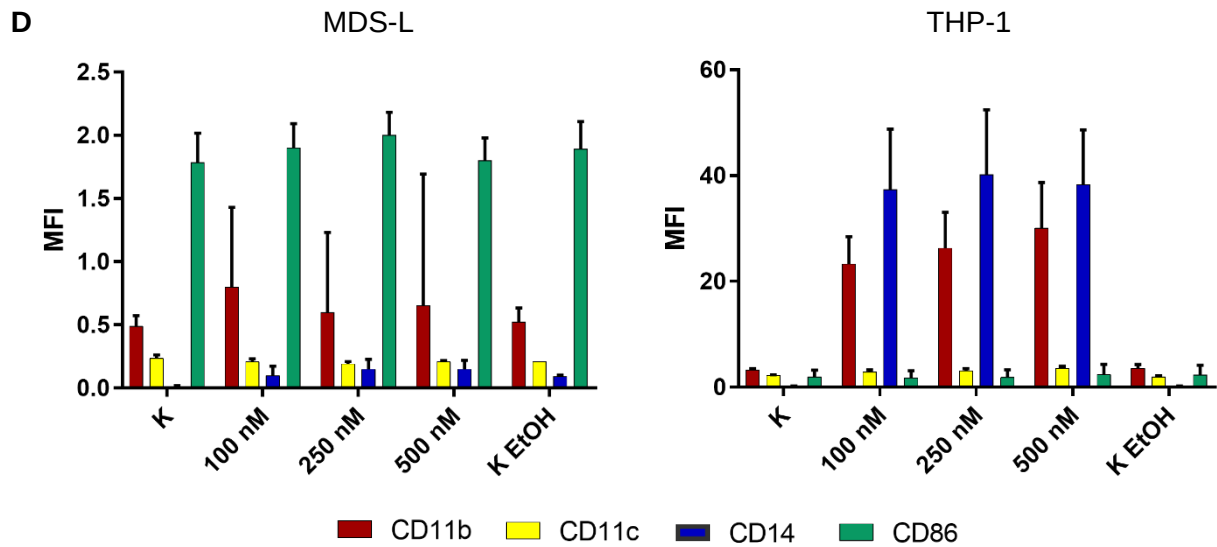
VI. Anhang

Anhang-Tabelle 1: Detailinformationen zu den verwendeten Zelllinien.

					HLA-Status				
	Zelltyp	Ursprung	Verdopplungszeit	Besonderheiten	Klasse I			Klasse II	
THP-1	akute monozytische Leukämie (AML-M5)	peripheres Blut eines 1 Jahr alten Kindes ♂, 1978	40 - 50 h	-	A2 A24(9)	B15 B35 [Bw6 positiv]	Cw3	DR1 DR15(2) DR51	DQ5(1) DQ6(1)
MDS-L	blastische Sublinie der MDS92 (MDS-Linie)	Knochenmark einer 54 Jahre alten Person ♂, 1991	36 - 48 h	IL-3 abhängiges Wachstum	A11 A24(9)	B62(15) B55(22)	Cw1 Cw4	DR4 DR53	DQ8 (3)

Anhang-Abbildung 1: Durchflusszytometrische Auswertung der Konzentrationsreihenbehandlung der MDS-L- und THP-1-Zellen mit ATRA (A), PMA (B), PMAr (C) und VitD (D).



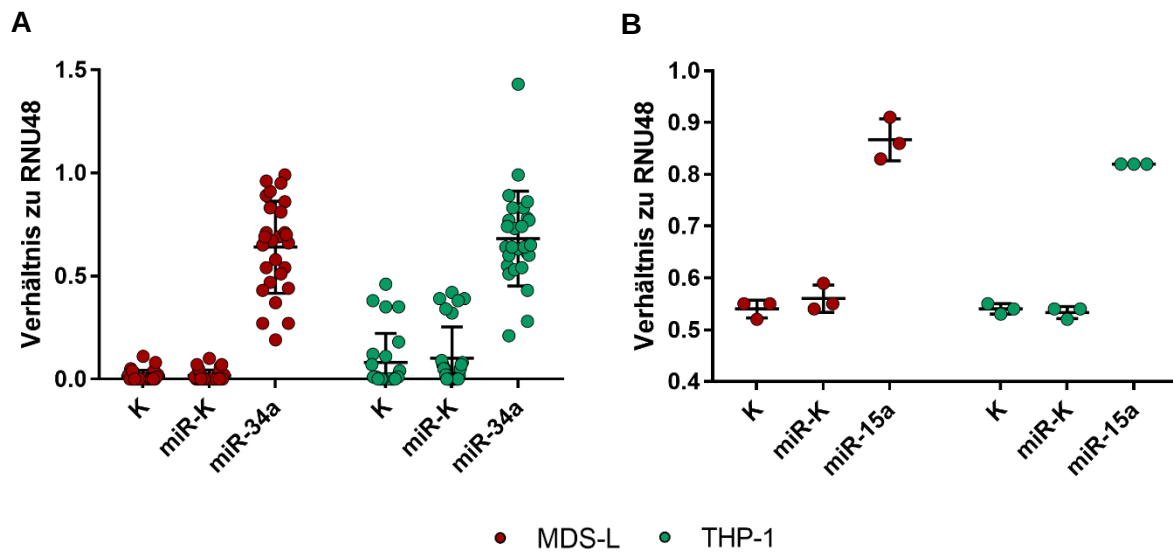


Es sind die *Median Fluorescence Intensity*- Werte (MFI) der Oberflächenexpressionen nach 48-stündiger Stimulation mit den unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen Stimulantien dargestellt. Sowohl unstimulierte Kontrollen (K) als auch Lösungsmittelkontrollen (DMSO und EtOH) wurden mitgeführt und identisch analysiert. Die Werte der ungefärbten Proben wurden jeweils abgezogen. n=3; $\pm$ SD.

Anhang-Tabelle 2: Detailinformationen zu den verwendeten PBMC-Spendern.

	HLA-Klasse I			HLA-Klasse II					
Geschlecht	A	B	C	DR	DQ	Größe [cm]	Gewicht [kg]	BMI	Alter
m	3,23	7,38	-	-	-	172	58	19,6	39
m	1,30	18,38	-	-	-	174	80	26,4	46
m	23,25	35,44	4	-	-	189	100	28,0	49
m	1,3	8,41	7,17	07,03(17)	02,-	168	72	25,5	50
m	2,2	7,62	w10, w3	4,15	8,6	181	86	26,3	58
m	11,25	44,62	-	DRB1*01,04	DQB1*03,05	179	82	25,6	59
m	1,3	8,60	3, 7	4, 17	2, 8	167	61	21,9	60
m	1,29	8,44	-	-	-	178	78	24,6	61
m	1,29	45,57	6	-	-	183	112	33,4	62
m	1,29	8,44	-	-	-	178	79	24,9	63
m	1,3	8,62	-	-	-	175	82	26,8	64
m	1	5,13	-	-	-	182	87	26,3	67
m	3	7	-	-	-	176	94	30,3	77
w	3,28	44,61	-	-	-	169	78	27,3	31
w	3,26	7,38	-	-	-	174	83	27,4	46
w	1,32	8,-	-	-	-	166	63	22,9	50
w	1	35	-	-	-	162	66	25,1	51
w	3,11	27,35	-	-	-	168	76	26,9	53
-	3,11	27,57	-	-	-	-	77	-	61

Anhang-Abbildung 2: Überexpression der mikroRNAs miR-15a (**A**) und miR-34a (**B**) in MDS-L- und THP-1-Zellen.



Dargestellt sind jeweils die Expressionslevel der mikroRNAs in den unbehandelten Kontrollen (K), den mit der *mimic*-Kontrolle transfizierten Proben (miR-K) und den mit miR-*mimics* transfizierten Proben im Verhältnis zum *Housekeeper* RNU48. n=3-27; $\pm$ SD.

Anhang-Tabelle 3: Prozentualer Anteil ausgewählter Zellpopulationen in MDS- (1-10) und nicht-MDS-Knochenmarksproben (NM 11- 15; KS 16- 21).

Probe	IPSS_R	Parentalpopulation CD45 ⁺				Parentalpopulation CD3 ⁺	
		CD34 ⁺ [%]	CD117 ⁺ [%]	CD34 ⁺ /CD117 ⁺ [%]	CD3 ⁺ [%]	CD4 ⁺ [%]	CD8 ⁺ [%]
1 *	<i>high</i>	0,9	17,7	0,53	29,1	11,5	84,7
2	<i>high</i>	0,46	19,5	0,57	22	97,6	2,16
3	<i>high</i>	1,32	1,56	0,53	41,4	68,8	31
4 *	<i>high</i>	4,84	7,47	7,47	37,6	54,1	45,2
5	<i>high</i>	25,4	10,18	0,71	3,98	56,8	39,88
6	<i>very low</i>	2,95	6,96	4,72	19,9	54,4	43,6
7	<i>high</i>	3,03	3	0,97	61,6	22,2	72,3
8 *	<i>high</i>	1,76	21,1	9,68	31,3	14,9	84,7
9	<i>high</i>	9,21	21,2	2,27	8	23,2	60
10	<i>high</i>	n.b.	12,1	n.b.	32,8	94,1	3,26
NM 11	-	2,22	2,92	0,44	41,9	35,3	50,3
NM 12	-	3,64	4,01	1,65	43,8	39,6	52
NM 13 *	-	2,92	8,4	2,22	51,7	68,8	31
NM 14 *	-	1,23	2,84	0,02	71,1	62,9	33,3
NM 15 *	-	0,17	0,42	0,01	67,7	65	30,5
KS 16	-	0,78	0,21	0,047	26,1	4	93,4
KS 17	-	0,45	0,36	0	28,4	93,7	5,57
KS 18	-	4,1	0,63	0,42	19,1	58,6	33
KS 19	-	1,79	7,72	0,75	89,2	14,1	76,9
KS 20	-	0,21	0,18	0	4,74	5,11	83,1
KS 21	-	5,18	0,61	0,13	57,1	1,45	93,4

Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse konnte der prozentuale Anteil von CD34⁺, CD117⁺ und CD3⁺ Zellen aus der Parentalpopulation CD45⁺ Zellen ermittelt werden. Die zum Sortieren vorgesehenen Populationen CD4⁺ und CD8⁺ konnten aus der Parentalpopulation CD3⁺ ermittelt werden. Für die MDS-Proben ist zusätzlich der *International Prognostic Scoring System_Revised* (IPSS_R) angegeben. Die mit * gekennzeichneten Proben wurden für miRNA-Microarray-Analyse verwendet. n.b. = nicht bestimmbar.

Anhang-Tabelle 4: Detailinformationen zu den verwendeten nicht-MDS-Knochenmarkspendern.

	Alter	Geschlecht	Ethnische Zugehörigkeit	Größe [cm]	Gewicht [kg]	Raucher	Medikamente	HLA-Status
NM 11	41	männlich	afroamerikanisch	k.A.	k.A.	ja	k.A.	A02 A31 B45 B51 C15 C16
NM 12	45	männlich	afroamerikanisch	k.A.	k.A.	nein	k.A.	A11 A26 B07 B15 C04 C07
NM 13	63	männlich	kaukasisch	188	110,7	nein	nein	k.A.
NM 14	43	weiblich	kaukasisch	168	56,2	nein	nein	k.A.
NM 15	53	weiblich	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.

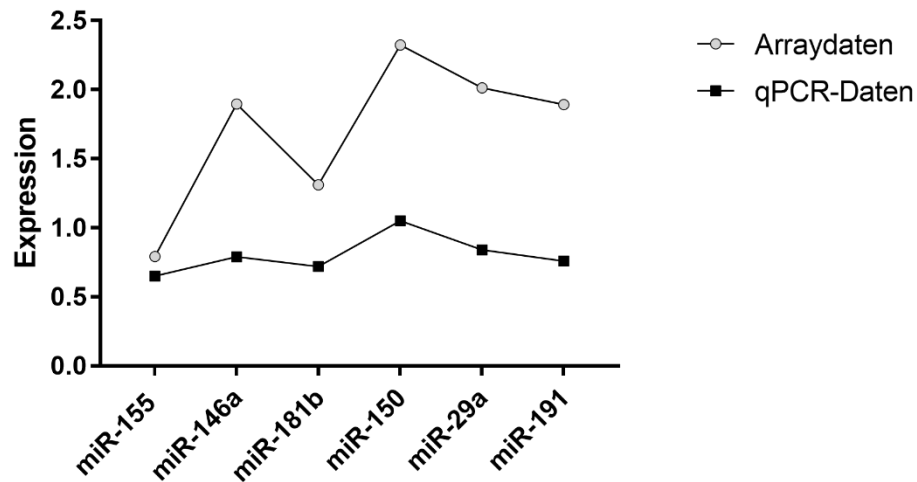
Anhang-Tabelle 5: Detailinformationen zu den verwendeten MDS-Knochenmarksproben.

	Alter	Geschlecht	Diagnose	IPSS_R	BMI	WBC ¹	Zyto-/Molekulargenetik	MDS-Behandlung (zum Zeitpunkt der Probennahme)	Behandlungsstart nach Probennahme	Überleben
1	64	männlich	MDS	high	21,6	2,5	normal	keine	ja, Azacitidin	11 Monate nach Probennahme verstorben (AML)
2	68	männlich	MDS	high	30,1	4	normal	keine	nein	4 Monate nach Probennahme verstorben
3	70	männlich	MDS	high	30,8	4,8	.-7	keine	ja, Azacitidin	k.A.
4	73	männlich	MDS	high	26,9	2,5	(3;3), -7	keine	nein	18 Monate nach Probennahme verstorben
5	78	männlich	MDS	high	k.A.	16,4	.-6, -7, -19, -21, der(6)t(6;21), der(7)t(6;7;2)	keine	ja, Azacitidin	14 Tage nach Probennahme verstorben
6	83	männlich	MDS	very low	25,4	10,6	DNMT3A, SF3B1, GATA2 (VUS)	Erythropoietin	-	k.A.
7	66	weiblich	MDS	high	31,2	2	.-3, -5, -11, -18, -20, +2mar	keine	nein	6 Monate nach Probennahme verstorben
8	70	weiblich	MDS	high	26,3	2,7	normal	keine	ja, Azacitidin	19 Monate nach Probennahme verstorben
9	70	weiblich	MDS	high	27,2	13,5	del(q5)	keine	ja, Azacitidin	20 Monate nach Probennahme verstorben (AML)
10	87	weiblich	MDS	high	23,4	2,6	del(q5)	keine	nein	5 Wochen nach Probennahme verstorben

Anhang-Tabelle 6: Detailinformationen zu den verwendeten Körperspenderproben.

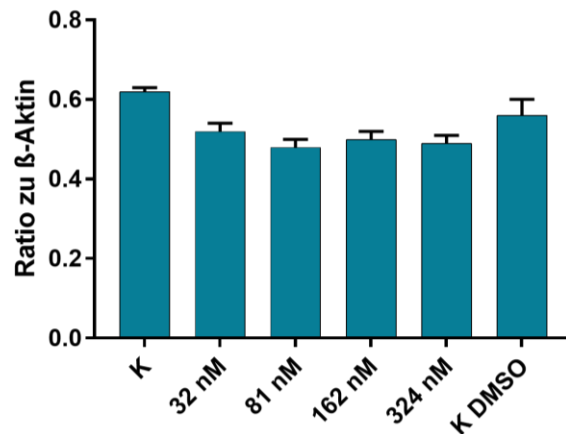
	Alter	Geschlecht	Größe [cm]	Gewicht [kg]	Zeitspanne Tod bis Probenentnahme (hh:mm)	Bemerkungen
KS 16	71	männlich	182	58	09:00	Kolonkarzinom, Leber- und Gallenkarzinom, bösartige Neubildung am Peritoneum
KS 17	76	männlich	175	95	23:30	Diabetes mellitus, VASK, Demenz, akute Hypertonie, koronare Herzkrankheit, akut. Koronarinsuffizienz
KS 18	77	männlich	178	82	14:15	metast. Nierenkarzinom, Harnwegsinfekt, akutes Nierenversagen, Influenza B, isch. Kardiomyopathie
KS 19	81	männlich	177	60	25:30	mal. Herzrhythmusstörung, bds. VHF, multiple Hirninfarkte (3 Jahre vor dem Tod), Demenz, M. Parkinson, Skoliose, Harnblasenkarzinom, chron. Nierenkrankheit, Arthrose bds., Polyneuropathie
KS 20	100	männlich	165	70	11:00	VASK, Enzephalopathie, Pneumonie, art. Hypertonie, Hypothyreose (unter Therapie euthyreot), Demenz, ethyltox. Pankreatitis
KS 21	83	weiblich	155	73	32:00	hochgradige Herzrhythmusstörungen, akutes Koronarsyndrom, koronare Herzerkrankung

Anhang-Abbildung 3: qPCR-Validierungsdaten ausgewählter mikroRNA-Kandidaten in CD8⁺ T-Zellen exemplarisch an einer ausgewählten Knochenmarkprobe dargestellt.



Mittels q-PCR wurden für die mikroRNAs miR-155, miR-146a, miR-181b, miR-150, miR-29a und miR-191 Validierungen der MikroRNA-Array-Analysen in CD8⁺ T-Zellen durchgeführt. Die qPCR-Daten sind auf RNU48 normalisiert und die *Array*-Daten auf den *Spike-in*. Diese beiden Normalisierungen sind parallel aufgetragen und geben das Verhältnis der dargestellten mikroRNAs zueinander wieder.

Anhang-Abbildung 4: RNA-Expressionsanalyse des Transkriptionsfaktors PTTG1 unter Stimulation der THP-1-Zellen mit verschiedenen PMA- Konzentrationen.



Dargestellt ist das Verhältnis der Ct-Werte von PTTG1 gegen den *Housekeeper* β-Aktin. n=3; ±SD.

VII. Lebenslauf

Berufliche & Akademische Laufbahn

seit 10/2021	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Anatomie und Zellbiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/2018- 09/2021	Stipendiatin nach dem Graduiertenförderungsgesetz des Landes Sachsen-Anhalt
01/2018- 09/2018	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Anatomie und Zellbiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
12/2016- 12/2017	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Medizinische Immunologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
01/2014- 12/2014	studentische Hilfskraft am Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik, Universitätsklinikum Leipzig Aufgabenbereich: DNA-Extraktion, Dokumentation
10/2013- 10/2015	Biochemie-Masterstudium an der Universität Leipzig Schwerpunkt Biomedizin Abschluss: Master of Science
07/2010- 06/2011	studentische Hilfskraft am Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik, Universitätsklinikum Leipzig Aufgabenbereich: Auswertung massenspektrometrischer Analysen
10/2009- 09/2013	Biochemie-Bachelorstudium an der Universität Leipzig Abschluss: Bachelor of Science
08/2007- 09/2009	Medizinisch-technische Laboratoriumsassistentin in der Gemeinschaftspraxis für Pathologie Dr. Schneider/ Dipl.-Med. Schmidt, Leipzig

Ausbildung

08/2004- 07/2007	Medizinische Berufsfachschule am Universitätsklinikum Leipzig AÖR Abschluss: Medizinisch-technische Laboratoriumsassistentin
------------------	---

Schulische Laufbahn

08/1996- 07/2004	Humboldt-Gymnasium Ebersbach (Sachsen) Abschluss: allgemeine Hochschulreife
08/1992- 07/1996	Grundschule Neusalza-Spremberg

VIII. Publikationsliste

Arlt E, **Kindermann A**, Fritsche A-K, Navarrete Santos A, Kielstein H, Bazwinsky-Wutschke I (2024) A Flow Cytometry-Based Examination of the Mouse White Blood Cell Differential in the Context of Age and Sex. *Cells* 13. doi: 10.3390/cells13181583

Kraya T, Quandt D, Pfirrmann T, **Kindermann A**, Lampe L, Schroeter ML, Kohlhasse J, Stoevesandt D, Hoffmann K, Villavicencio-Lorini P (2019) Functional characterization of a novel CSF1R mutation causing hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. *Mol Genet Genomic Med* 7:e00595. doi: 10.1002/mgg3.595

Grünberg M, Quandt D, Cynis H, Demuth H-U, **Kindermann A**, Magdolen V, Forssmann W-G, Seliger B, Mägert H-J (2018) Kallikrein-related peptidases are activators of the CC chemokine CCL14. *Eur J Immunol* 48:1592–1594. doi: 10.1002/eji.201747452

Kongresse und Kongressbeiträge

4. Kongress für Doktorandinnen und Doktoranden der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 10.-11.11.2017, Halle (Saale), Poster: Immunological control of the stem cell niche by microRNAs in MDS patients

27th Bilateral Symposium Poznań-Halle “*Rare diseases in clinical practice*”, 15.-17.12.2017, Poznań, Poster: Immunological control of the stem cell niche by microRNAs in MDS patients

Tumor Immunology Meets Oncology (TIMO) XIV, 24.-26.05.2018, Halle (Saale), Poster: *Myelodysplastic Syndromes – The role of microRNAs in disease initiation, progression and immunological control*

European Congress of Immunology 2018, 02.-05.09.2018, Amsterdam, Poster: *Myelodysplastic Syndromes – The role of microRNAs in disease initiation, progression and immunological control*

International Meeting of the German Society for Cell Biology 2018 (DGZ2018), 17.-19.09.2018, Leipzig, Poster: *Myelodysplastic Syndrome – how MicroRNAs influence the cell fate*

5. Forschungstag - Motto: *Bridging the Gap*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; 30.09.2018, (Halle (Saale), Poster: *Myelodysplastic Syndrome – Role of microRNAs and immune cells*

Annual Meeting of the AGD (Arbeitsgemeinschaft für gen-Diagnostik e.V.) 2018, 05.-06.10.2018; Potsdam, Poster: *Myelodysplastic Syndrome – Role of microRNAs and immune cells*

II Joint Meeting of the DGfI and the SIICA, 10.-13.09.2019, München, Poster: *Myelodysplastic Syndrome - the role of microRNAs and T cells*

6th Research Day - Topic: Crossing the Line, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 22.10.2019, Halle (Saale), Poster: *Myelodysplastic Syndrome - the role of microRNAs and T cells*

Science Retreat, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 19.12.2019, Halle (Saale), Vortrag: *Myelodysplastisches Syndrom - die Rolle von mikroRNAs und T-Zellen*

7.Forschungstag, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 20.03.2022, Halle (Saale), Poster: *Myelodysplastisches Syndrom - die Rolle von mikroRNAs*

34. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, 27.-29.09.2023, Würzburg, Poster: *T cell microRNAs and their impact on myelodysplastic neoplasms*

IX. Danksagung

Ich möchte mich herzlichst bei Frau Prof. Dr. Heike Kielstein bedanken, die Möglichkeit erhalten zu haben, dieses spannende Thema im Institut für Anatomie und Zellbiologie bearbeiten zu können. Darüber hinaus gilt mein Dank ihrer stetigen Unterstützung und natürlich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Vielen Dank an Herrn PD Dr. Stephan König für seine Unterstützung, seine Geduld und für die Übernahme des Erstgutachtens meiner Dissertation.

Ein weiterer Dank gilt Frau Prof. Dr. Monika Brunner-Weinzierl für die Übernahme des externen Gutachtens dieser Arbeit.

Mein aufrichtiger Dank gilt Frau Dr. Dr. habil Dagmar Quandt. Mit ihrer wissenschaftlichen Expertise, den hilfreichen Diskussionen und vielen Ratschlägen war sie eine großartige Unterstützung beim Erstellen dieser Dissertation. Außerdem danke ich ihr für ihre unermüdliche Motivation und ihre Geduld.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die große Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima. Spezieller Dank gilt hier Franziska Knöfel und Susann Möschter, die in sämtlichen Laborbelangen eine Unterstützung waren und immer eine Lösung für jedes noch so große ‚Laborproblem‘ parat hatten.

Des Weiteren danke ich den Mitarbeiter*innen der *Core Facilitys* Analyse und Durchflusszytometrie der MLU, die mich bei der Umsetzung meiner Projekte exzellent unterstützt haben. Dr. Markus Glaß (*Core Facility Imaging*) danke ich für die Unterstützung bei der Auswertung der *Microarray*-Daten.

Ebenso danke ich den Präparator*innen Frau Julia Hallasch und Herrn Achim Heine und den beteiligten medizinischen Doktorand*innen für ihre Unterstützung bei der Entnahme der Knochenmarkproben der Körperspender*innen.

Ein weiterer Dank gilt den Kolleg*innen des Instituts für Anatomie und Zellbiologie. Die vielen netten Gespräche haben eine angenehme Arbeitsatmosphäre geschaffen.

Zuletzt, aber nicht weniger wichtig, möchte ich Philipp meinen tiefsten Dank aussprechen. Ohne den mentalen Beistand und die geduldige und liebevolle Unterstützung wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen. Danke.