

**Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV des Universitätsklinikums  
Halle (Saale) und dem Landeszentrum für Zell- und Gentherapie des Universitätsklinikums  
Halle (Saale)**

**(Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schmoll)**

**Das molekulare Netzwerk zwischen der miRNA-223, C/EBP $\alpha$  und  
E2F1 in der Granulopoese und in der akut myeloischen Leukämie**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades**

**Doktor der Medizin (Dr.med.)**

**vorgelegt**

**der Medizinischen Fakultät**

**der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**von Viola Dengler**

**geboren am 10.05.1983 in Freiburg i.Br.**

**Betreuer: PD Dr. med. Gerhard Behre**

**Gutachter: Prof. Dr. med. Hüttelmaier**

**Prof. Dr. med Lübbert, Freiburg**

**Datum der Disputation: 26.04.2010**

**meinen Eltern**

## Referat und bibliographische Beschreibung

Die Differenzierung der verschiedenen Zelltypen im hämatopoetischen System unterliegt der Kontrolle und Regulation zelllinienspezifischer Faktoren. Dabei sind Transkriptionsfaktoren (TF) die klassischen Faktoren, die diese genregulierenden Funktionen besitzen und ausüben. Seit kürzerer Zeit kennt man eine neue Klasse von Genregulatoren, sogenannte microRNAs. Diese kleinen, nicht proteinkodierenden RNAs haben Einfluss auf verschiedenste biologische Vorgänge, wie die Differenzierung, Proliferation und Apoptose. Dabei üben microRNAs eine negativ regulatorische Wirkung vornehmlich auf posttranskriptioneller Ebene aus.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Rolle der miRNA-223 während der granulozytären Differenzierung und ihre Regulation durch den für die Granulopoese essentiellen Transkriptionsfaktor C/EBP $\alpha$ , in der normalen Hämatopoese und während der Leukämogenese. Durch Sequenzanalyse konnte der proliferationsfördernde Transkriptionsfaktor E2F1 als potentielles Zielgen der miRNA-223 identifiziert werden. Interessant hierbei war, dass die Inhibition von E2F1 einen kritischen Schritt in der Granulopoese darstellt, der durch C/EBP $\alpha$  gewährleistet wird, wobei der genaue Mechanismus hierfür bisher nicht vollständig geklärt ist. Durch Luziferase Assays, sowie Überexpressions- und ‚Knockdown‘-Experimente in verschiedenen myeloischen Zelllinien konnte E2F1 als funktionelles Zielgen der miRNA-223 bestätigt werden. Die miRNA-223 medierte Hemmung der E2F1 Translation konnte dabei als einer der Mechanismen identifiziert werden, durch die C/EBP $\alpha$  die E2F1 Inhibition in der Granulopoese sicherstellt. Da E2F1 eine zellwachstumsfördernde Funktion besitzt, wurde weiter angenommen, dass die miRNA-223 antiproliferative Eigenschaften besitzt. Dies bestätigte sich Experimenten zur Zellproliferation und in der -zyklusanalyse. Da microRNAs auch in der Tumorgenese eine Rolle spielen, bestand desweiteren Interesse an der Untersuchung der Bedeutung der miRNA-223 in der akut myeloischen Leukämie (AML), deren typisches Merkmal ein Differenzierungsblock und eine Akkumulation undifferenzierter myeloischer Vorläuferzellen ist. Bei Untersuchungen zeigte sich ein reduziertes miRNA-223 Expressionslevels in Patientenproben verschiedener AML-Subtypen mit vorliegender C/EBP $\alpha$  Funktionsstörung. Darüber zeigte sich die Existenz eines regulativen Schaltkreises, eines ‚Feedback-Loops‘, durch den E2F1 negativ regulatorisch auf die miRNA-223 Transkription wirkt.

Dengler, Viola : Das molekulare Netzwerk zwischen der miRNA-223, C/EBP $\alpha$  und E2F1 in der Granulopoese und in der akut myeloischen Leukämie.  
Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 77 Seiten, 2009

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Hämatopoese .....	1
1.2	Leukämien .....	2
1.2.1	Die akut myeloische Leukämie.....	3
1.3	Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoese .....	4
1.4	Die CCAAT/enhancer-binding Proteine .....	5
1.4.1	C/EBP $\alpha$ .....	6
1.4.2	Funktionen von C/EBP $\alpha$ .....	6
1.4.3	Die Rolle von C/EBP $\alpha$ in der normalen Hämatopoese .....	7
1.4.4	Die Rolle von C/EBP $\alpha$ in der Leukämogenese .....	7
1.4.5	C/EBP $\alpha$ und E2F1.....	8
1.5	microRNAs .....	10
1.5.1	Biogenese der miRNAs .....	10
1.5.2	Funktionsweise der miRNAs.....	11
1.5.3	miRNAs und Transkriptionsfaktoren .....	12
1.5.4	miRNAs in der Tumorgenese.....	12
1.5.5	miRNAs in der Hämatopoese .....	13
1.5.6	miRNA-223 .....	15
1.6	Zielstellung .....	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1	Materialien .....	17
2.1.1	Reagenzien .....	17
2.1.2	Reaktionskits .....	18
2.1.3	Enzyme und Marker .....	18
2.1.4	Plasmide, Oligonukleotide und Reporterkonstrukte.....	19
2.1.5	Primer und Antikörper .....	20
2.1.6	Biologische Materialien.....	21
2.1.7	Kulturmedien.....	22
2.2	Methoden.....	23
2.2.1	Zellkultur.....	23
2.2.2	RNA-Isolation.....	23
2.2.3	Reverse Transkription.....	23

2.2.4	Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion.....	23
2.2.5	Real-time-Polymerase-Kettenreaktion.....	24
2.2.6	Transiente Transfektion eukaryoter Zellen.....	24
2.2.7	Transiente Transfektion von adhärenen Zellen mit Lipofectamin <sup>TM</sup> Reagent und von Suspensionszellen mit Lipofectamin <sup>TM</sup> 2000 oder Effectene <sup>TM</sup> .....	25
2.2.8	Transiente Transfektion gelöster Zellen mit AMAXA.....	25
2.2.9	Dual-Luciferase <sup>TM</sup> Reporter-Assay.....	25
2.2.10	Proteinbestimmung mit dem Bio-Rad-Assay.....	26
2.2.11	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	26
2.2.12	Western Blot.....	26
2.2.13	β-Estradiol- und RA-Induktion.....	27
2.2.14	Gewinnung von Plasmiden.....	27
2.2.15	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	27
2.2.16	Klonierung.....	28
2.2.17	In-vitro-Mutagenese.....	28
2.2.18	Durchflusszytometrie.....	28
2.2.19	Zellzyklus Analyse.....	29
2.2.20	Statistik.....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
3.1	C/EBPα induziert die miRNA-223 Expression.....	30
3.2	E2F1 ist ein funktionelles Zielgen der miRNA-223.....	32
3.3	Die Bedeutung der miRNA-223 und der E2F1-Inhibition für die Granulopoese.....	38
3.4	Antiproliferative Funktion der miRNA-223.....	44
3.5	Verschiedene AML Subtypen weisen ein reduziertes miRNA-223 Expressionslevel auf....	46
3.6	E2F1 reguliert in einem ‚Feedback-Loop‘ die miRNA-223 Transkription.....	49
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>54</b>
4.1	Kontext der Arbeit.....	54
4.2	E2F1- ein neues miRNA-223 Zielgen.....	56
4.3	E2F1- ein Repressor der miRNA-223.....	57
4.4	Biologische Relevanz.....	60
4.5	Bedeutung der miRNA-223 in der akut myeloischen Leukämie.....	61
4.6	Perspektiven.....	63
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>65</b>

<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>Thesen .....</b>	<b>76</b>

## Abkürzungsverzeichnis

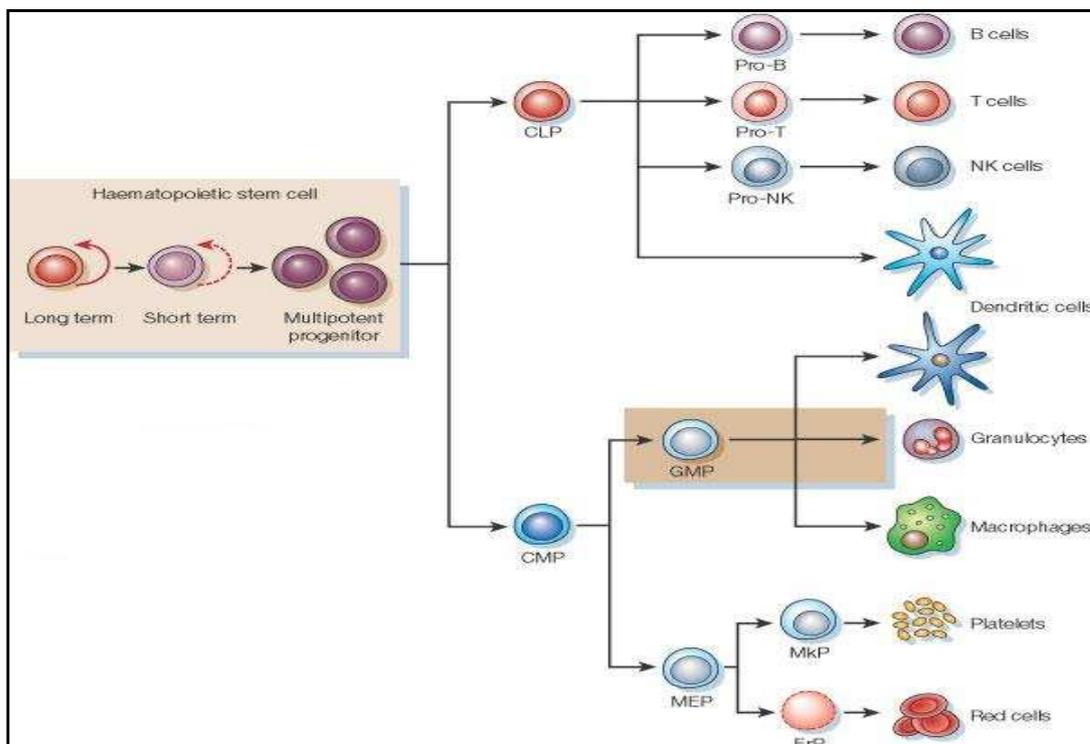
Abb.	Abbildung
AML	Akut myeloische Leukämie
APL	Akut Promyelozyten Leukämie
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
bZIP	basic region leucine zipper
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
Cdk	Cyclin dependent kinase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C/EBP $\alpha$	CCAAT Enhancer bindendes Protein alpha
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CMP	Common Myeloid Progenitor
CML	Chronisch myeloische Leukämie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat
ETO	Eight-twenty-one
FAB	French American British
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorter
FBS	Fetal Bovine Serum
G	Gramm
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte-Makrophage Colony Stimulating Factor
GMP	Granulocyte-Macrophage Progenitor
H	Stunde
HSC	Hematopoietic Stem Cell
HWZ	Halbwertszeit
Inv	Inversion
kDa	Kilodalton
LNA	Locked nucleic acid
M	Molar
M-CSF	Makrophage-Colony-Stimulating Factor

MEP	Megacaryocytic Erythroid Progenitor
mRNA	messenger RNA
Min	Minuten
miRNA, miR	microRNA
ml	Milliliter
mut	Mutant
N	Nano
nBM	normal Bone Marrow
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PML	Promyelozyten-Leukämie-Gen
RAR $\alpha$	Retinolsäurerezeptor alpha
qRT-PCR	quantitative Real Time Polymerase-Ketten-Reaktion
RISC	RNA-induced silencing complex
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkription
RNA	Ribonukleinsäure
S	Sekunden
siRNA	short interfering RNA
T	Translokation
TA	Transactivation Domain
Taq	Thermus aquaticus
TE	Transactivation Element
TF	Transkriptionsfaktor
U	Units
vgl.	Vergleiche
wt	Wildtyp
zw.	Zwischen

## 1 Einleitung

### 1.1 Hämatopoese

In der Hämatopoese entwickeln sich über mehrere hierarchisch organisierte Zwischenschritte durch Proliferation und Differenzierung aus den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) die reifen peripheren Blutzellen. Aufgrund der Kolonienbildung, die HSCs in Experimenten in Agarkultursystemen zeigen, werden sie auch als ‚colony forming units‘ (CFU) bezeichnet. Die Stammzellen besitzen sowohl die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, als auch zur Differenzierung in verschiedene multipotente Vorläuferzellen und lassen sich untergliedern in sogenannte ‚long-term‘ HSCs, ‚short-term‘ HSCs und die weiter differenzierte Form der multipotenten Vorläuferzellen<sup>93</sup>. Die Fähigkeit der Proliferation nimmt dabei mit zunehmender Differenzierung ab. Aus den determinierten Vorläuferzellen, die keine Selbsterneuerungsfähigkeit mehr besitzen, entwickeln sich zum einen die Vorläuferzellen aller lymphatischer Zellen (CLPs) und zum anderen die gemeinsamen Vorläuferzellen der myeloischen Reihe (CMPs). Aus den CMPs wiederum gehen die gemeinsamen Vorläuferzellen der Monozyten und Granulozyten hervor (GMPs). Letztere werden weiter unterteilt in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, sowie die MEPs, aus denen sich die Erythrozyten und Thrombozyten entwickeln.



**Abb. 1: Entwicklung der verschiedenen Zelllinien in der Hämatopoese**

Quelle: in Anlehnung an Reya et al., Nature, 2001

Der dynamische Prozess der Hämatopoese findet lebenslang statt, ist jedoch in den einzelnen Entwicklungsstadien anatomisch unterschiedlich lokalisiert<sup>28</sup>

Essentiell für die Steuerung der Hämatopoese sind die, sich neben den hämatopoetischen Stammzellen und den Fettzellen, im Knochenmark befindlichen Endothel- und Stromazellen. Sie sind zuständig für die Herstellung des, für die Hämatopoese benötigten Milieus. Es handelt sich hierbei um die Synthese verschiedenster, die Stamm- und Vorläuferzellen stimulierender und inhibierender Faktoren. Die Blutzellen ihrerseits zeigen mit zunehmender Ausreifung und Verlust der Proliferationsfähigkeit eine zelllinienspezifische Genexpression und die verschiedenen sich entwickelnden Zelllinien und Reifungsstufen exprimieren charakteristische Zelloberflächenmarker, sogenannte ‚cluster of differentiation‘ (CD). Die hämatopoetische Stammzelle zeichnet sich durch die Oberflächenexpression von CD34 aus.

## 1.2 Leukämien

Der Hauptfokus in der Krebsforschung liegt auf der Identifikation von Onkogenen und Tumorsuppressoren und auf der Charakterisierung der durch sie beeinflussten Abläufe. Dabei kommt vor allem einer Störung im Differenzierungsablauf von der Vorläufer- zur reifen Zelle eine ursächliche Bedeutung zu. In verschiedenen Formen der Leukämie konnte die maligne Entartung als eine Blockierung im Ablauf der normalen Hämatopoese identifiziert werden.

Der Begriff Leukämie wird für eine heterogene Gruppe hämatologischer Erkrankungen verwendet. Diese sind charakterisiert durch eine Akkumulation hämatopoetischer Vorläuferzellen, die keiner terminalen Differenzierung unterzogen werden<sup>112</sup>. Die Leukämien lassen sich anhand ihres Verlaufs und der betroffenen Zelllinie grob in vier Gruppen unterteilen:

- Akut myeloische Leukämie (AML)
- Chronisch myeloische Leukämie (CML)
- Akut lymphatische Leukämie (ALL)
- Chronisch lymphatische Leukämie (CLL)

Die genauere diagnostische Einteilung ist vor allem für die Prognose und für die spätere Therapie wichtig und erfolgt anhand zahlreicher verschiedener Methoden.

Die Inzidenz der chronischen Leukämieformen liegt bei 1-3/100.000 Menschen in Deutschland<sup>37</sup>. Während chronische Leukämieformen nur im Erwachsenenalter vorkommen, ist die ALL die häufigste Krebserkrankung im Kindesalter. Die AML wiederum erreicht ihren Häufigkeitsgipfel erst beim alten Menschen, ab einem Alter von 65 Jahren liegt die Inzidenz bei 15/100.000<sup>37</sup>. Folgend soll aufgrund der Fragestellung nur auf die akut myeloische Leukämie eingegangen werden.

### 1.2.1 Die akut myeloische Leukämie

Bei der akut myeloischen Leukämie besteht eine maligne Transformation hämatopoetischer Vorläuferzellen, die speziell die Differenzierung myeloischer und myelomonozytischer Zellen betrifft. Es kommt zu einer verstärkten Proliferation dieser leukämischen Zellen klonalen Ursprungs und zur Expansion und Akkumulation der unreifen Blasten im Knochenmark. Dabei kommt es zur Verdrängung der normalen Hämatopoese sowie zur Ausschwemmung der Blasten ins periphere Blut. Klinisch leiden die betroffenen Patienten infolge der Verdrängung der normalen Hämatopoese an Anämie, an Blutungsneigung aufgrund der Thrombozytopenie und an einer durch die Leukopenie bedingten erhöhten Infektanfälligkeit.

Die Inzidenz akut myeloischer Leukämien liegt bei ca. 2,5/100.000<sup>37</sup>. Die Diagnose und Einteilung der AML erfolgt nach der French-American-British(FAB)-Klassifikation<sup>5</sup> anhand des Reifungsgrades der Blasten und ihrer Zelllinienzugehörigkeit und basiert auf der Analyse von Blut- und Knochenmarkausstrichen mittels zytomorphologischer Methoden (s.Tab.1). Daneben existiert auch eine neuere WHO-Klassifikation, die zusätzlich zyto- und molekulargenetische, sowie immunologische Alterationen, die bei 50% aller AML-Blasten zu finden sind, integriert und 4 große Gruppen unterscheidet<sup>33</sup> (s.Tab.2). Die zytogenetische Untersuchung erlaubt eine pathogenetisch basierte prognostische Einteilung der AML. Gemäß dieser sind die balancierten Translokationen t(8;21), t(15;17) und auch die Inversion inv(16) von günstiger Prognose, während der Verlust von Chromosomen 5 oder 7 und der komplexe Karyotyp mit einer schlechten Prognose assoziiert sind<sup>38</sup>.

Neuere Erkenntnisse schreiben vor allem Störungen in der Zellzykluskontrolle und in der Regulation des Differenzierungsprogrammes eine wichtige Bedeutung für die Leukämogenese zu. Desweiteren wird seit kürzerer Zeit das Konzept sogenannter „Leukämischer Stammzellen“ (LSCs) propagiert<sup>44</sup>. Es wird angenommen, dass diese Zellen, die eine geringe Differenzierungskapazität besitzen, eine Folge somatischer Mutationen sind. Dabei spielen, neben chromosomalen Aberrationen, die zur Bildung von Fusionsproteinen wie AML1-ETO oder PML-RAR $\alpha$  führen, vor allem Störungen wichtiger Schlüsselfunktionen innehabender Transkriptionsfaktoren eine bedeutende Rolle<sup>97</sup>.

**Tab. 1: FAB Klassifikationen**

Quelle: in Anlehnung an Löwenberg et al., N Engl J Med 1999

FAB-Subtyp	Morphologie	Karyotyp
M0	Blastär -undifferenziert	inv(3q26), t(3;3)
M1	Myeloblastär -undifferenziert	
M2	Myeloblastär -differenziert	t(8;21), t(6;9)
M3	Promyelozytär	t(15;17), t(11;17), t(5;17)
M4	Myelomonozytär	inv(3q26), t(3;3), t(6;9), 11q23
M4Eo	Myelomonozytär mit Eosinophilie	inv(16); t(16;16)
M5	Monozytär	t(8;16), 11q23
M6	Erythroblastär	
M7	Megakaryoblastär	t(1;22)

**Tab. 2: WHO-Klassifikation der AML, verkürzt**

Quelle: in Anlehnung an Harris et al., 1999

1. AML mit rekurrierenden zytogenetischen Anomalien	
2. AML mit multilineärer Dysplasie	
3. AML und MDS Therapie-assoziiert	
4. AML nicht anderweitig klassifiziert	MDS: myelodysplastisches Syndrom

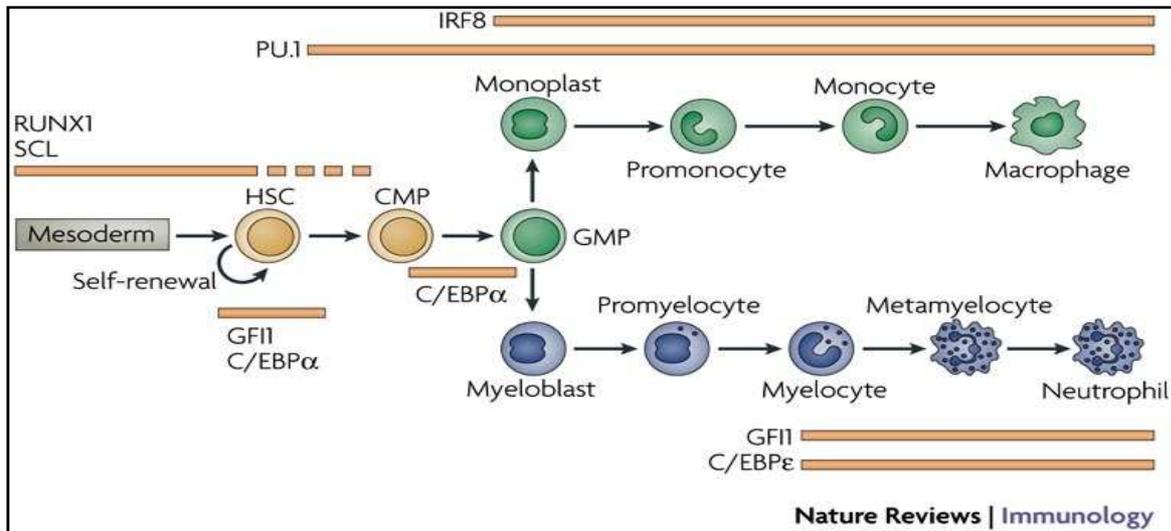
### 1.3 Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoese

In der Kontrolle und Regulation der Hämatopoese spielen Interaktionen verschiedenster Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle <sup>113</sup>. Transkriptionsfaktoren sind spezialisierte Proteine, die spezifisch an ihre DNA-Bindungselemente binden und so die Transkription verschiedener Gene beeinflussen. Sie können sowohl verstärkend als auch hemmend auf die Genaktivierung wirken. Die Modulation der Expression linienspezifischer Gene und das Muster der vorhandenen Transkriptionsfaktoren charakterisiert so die Linienzugehörigkeit und den Differenzierungsgrad einer Zelle.

Zu den wichtigsten Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung der Granulozyten (Granulopoese) zählen RUNX1 (runt-related transcription factor 1, auch bekannt als AML1)<sup>75</sup>, SCL (stem-cell leukemia factor, auch bekannt als Tal-1)<sup>102</sup>, PU.1 <sup>55</sup>, CCAAT/enhancer-binding Proteine (C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\epsilon$ )<sup>110,121,126</sup>, IRF8 (interferon-regulatory factor 8) <sup>42</sup> und GFI1 (growth-factor independent 1) <sup>41</sup>.

Die Expression von C/EBP $\alpha$  im hämatopoetischen System ist auf die Zellen der granulozytären und der monozytären Linien begrenzt. Dabei spielt C/EBP $\alpha$  eine besonders wichtige Rolle in der Granulo-

poese: infolge einer gezielten Ausschaltung von C/EBP $\alpha$  kommt es zu einer selektiven Blockierung der frühen granulozytären Differenzierung mit fehlender Weiterentwicklung der CMPs in das Stadium der GMPs ohne gleichzeitige Beeinflussung der übrigen Zelllinien<sup>126,128</sup>. Die, für die Granulopoese jenseits des GMP Stadiums wichtigen Transkriptionsfaktoren sind GFI1 und C/EBP $\epsilon$ .



**Abb. 2: Transkriptionsfaktoren in der Granulopoese**

Quelle: Rosenbauer F, Tenen DG, Nat Rev Immunology, 2007

#### 1.4 Die CCAAT/enhancer-binding Proteine

Die CCAAT/enhancer-binding Proteine bilden eine Familie von Transkriptionsfaktoren bestehend aus den sechs Mitgliedern C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\gamma$ , C/EBP $\delta$ , C/EBP $\epsilon$  und C/EBP $\zeta$ <sup>1,88,93</sup>. Sie gehören zur Gruppe der Leuzin-Zipper Transkriptionsfaktoren. Sie zeichnen sich durch hohe Sequenzgleichheit in den hochkonservierten C-terminalen DNA-Bindungs- und Dimerisationsdomänen (bZIP; basic region and leucin zipper) und einen, je nach Isoform, variablen N-terminalen Bereich aus. Die C/EBP Proteine können sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden<sup>1,95</sup>. Die C/EBP Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Differenzierung und Proliferation, aber auch bei verschiedenen Stoffwechselfvorgängen. Das gewebespezifisch unterschiedliche Expressionsmuster der C/EBP Proteine reflektiert ihre unterschiedlichen Funktionen abhängig vom jeweiligen Zelltyp. Die in der Hämatopoese derzeit bekannten C/EBPs sind C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  und C/EBP $\epsilon$ . Dabei kommt C/EBP $\alpha$  eine essentielle Bedeutung in der frühen Granulopoese, das heißt in der Differenzierung der hämatopoetischen Stammzelle zum Promyelozyten zu. Hingegen wird C/EBP $\epsilon$  eine entscheidende Rolle in der terminalen Differenzierung zugesprochen. C/EBP $\beta$  spielt speziell unter sogenannten „emergency conditions“, beispielsweise Infektionen und Zytokinausschüttungen, eine wichtige Rolle für die Granulopoese<sup>39</sup>.

### 1.4.1 C/EBP $\alpha$

C/EBP $\alpha$  ist das erstentdeckte Protein unter den C/EBPs und auch der erste entdeckte Leuzin-Zipper Transkriptionsfaktor<sup>60</sup>. Die spezifische DNA Sequenz, die von C/EBP $\alpha$  erkannt wird und an die es bindet lautet ‚CCAAT‘ und ist in vielen Promotoren von mRNA codierenden Genen vorhanden. C/EBP $\alpha$  wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert, darunter in hohem Maße in Fettgewebe und Leber, in Lunge, Darm, Haut, Plazenta sowie in mononukleären Zellen des peripheren Blutes<sup>3,7</sup>.

Die wichtigen Domänen von C/EBP $\alpha$  sind die N-terminal liegende Transaktivierungsdomäne, die für die transkriptionsaktivierende oder -inhibierende Funktion verantwortlich ist, sowie die DNA-Bindungsregion und die Dimerisationsdomäne ‚Leuzin-Zipper‘.

Das humane C/EBP $\alpha$  Gen liegt auf Chromosom 19q13.1, besitzt kein Intron und führt bei der Translation durch Verwendung unterschiedlicher Startcodons (AUGs) zur Bildung zweier verschieden großer Polypeptide, mit der Größe von 42kDa und 30kDa<sup>64,77</sup>. Letzteres zeigt ein begrenztes Aktivierungspotential und N-terminal fehlen die zwei Transaktivierungselemente.

### 1.4.2 Funktionen von C/EBP $\alpha$

C/EBP $\alpha$  fungiert einerseits als klassischer Transkriptionsfaktor durch Bindung und direkte Aktivierung von zelllinienspezifischen Promotoren. Andererseits übt das Protein seine regulatorischen Eigenschaften auch über direkte Protein-Protein Interaktionen aus. Man weiß inzwischen, dass C/EBP $\alpha$  mit seinen Transaktivierungselementen TE-I und TE-II mit dem basalen Transkriptionsapparat TBF/TFIIB<sup>72</sup> sowie mit Histonacetyltransferasen<sup>56</sup> interagiert. Desweiteren sind diese Elemente für die Repression des Transkriptionsfaktors E2F1 während der Granulopoese und der Adipogenese von Bedeutung<sup>87</sup>. Das Transaktivierungselement TE-III wird für die Rekrutierung des die Chromatinkonformation beeinflussenden Komplexes SW1/SNF<sup>81</sup> und für die Bindung und Inhibition von Cdk2/4 benötigt<sup>117</sup>. Die Interaktionen mit E2F1<sup>47</sup>, mit c-Jun<sup>91</sup> und mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie PU.1, GATA1 und RUNX1 werden über die C-terminal liegende bZIP-Domäne vermittelt<sup>92,125</sup>.

Das Besondere am Transkriptionsfaktor C/EBP $\alpha$  ist, dass das Protein neben der Funktion als Induktor und Regulator der Differenzierung, auch auf die Proliferation Einfluss nimmt, und zwar als Inhibitor des Zellzyklus<sup>51,68</sup>. C/EBP $\alpha$  stellt einen wesentlichen Faktor für die Aufrechterhaltung der Balance zwischen Zellproliferation und Differenzierung<sup>114,115</sup>. Für die Vermittlung seiner antiproliferativen Funktion werden verschiedene Mechanismen in Erwägung gezogen. Unter den verschiedenen Annahmen bezüglich dessen, wie das Protein diesen Zellzyklus Arrest induziert, ist eine der meist akzeptierten die C/EBP $\alpha$ -vermittelte Repression von E2F1. Daneben gibt es Hinweise auf eine Kontrolle des Zellzyklus durch C/EBP $\alpha$  induzierte Aktivierung von p21 (WAF1)<sup>114</sup>, sowie durch Interaktionen von C/EBP $\alpha$  mit den Cyclin abhängigen Kinasen (‚cyclin dependent kinase‘) Cdk2 und Cdk4<sup>118</sup>. Auch das Interagieren mit dem, die Chromatinkonformation beeinflussenden Komplex SW1/SNF spielt im

C/EBP $\alpha$  vermittelten Zellzyklusarrest eine Rolle<sup>71</sup>. Nicht zuletzt scheint es auch abhängig vom Gewebe zu sein, welcher der genannten Mechanismen bei der Induktion des Zellzyklusarrests jeweils dominiert. Experimente im myeloischen System deuten darauf hin, dass dort die C/EBP $\alpha$  vermittelte E2F1 Repression den bedeutendsten zellzyklusinhibierenden Mechanismus darstellt<sup>16,87,96</sup>.

### 1.4.3 Die Rolle von C/EBP $\alpha$ in der normalen Hämatopoese

Die größte Bedeutung von C/EBP $\alpha$  in der Hämatopoese liegt in der Regulation der Differenzierung der Granulozyten und spiegelt sich in der Entdeckung einer großen Zahl myeloischer Gene, deren Promotoren C/EBP $\alpha$  Bindungsmotive enthalten, wider<sup>113</sup>. Weitere Hinweise brachten Experimente mit konventionellen C/EBP $\alpha$ <sup>-/-</sup> (C/EBP $\alpha$ -Knockout)-Mäusen, deren Blutzellen einen selektiven Block in der frühen granulozytären Reifung und dadurch bedingt ein Fehlen funktionsfähiger reifer Granulozyten, ohne eine Auswirkung auf andere Zelllinien, aufweisen<sup>126</sup>. Die Expression von C/EBP $\alpha$  wird spezifisch in der frühen Granulopoese hochreguliert und seine konditionelle Überexpression alleine ist ausreichend, um die granulozytäre Differenzierung zu induzieren und gleichzeitig die Reifung monozytären Zellen zu inhibieren<sup>89</sup>. Weitere Experimente in CD34+ hämatopoetischen Stammzellen zeigten, dass die retrovirale Expression von C/EBP $\alpha$  in diesen Zellen deren Differenzierung in Richtung Granulozyten zu induzieren vermag<sup>46</sup>. Konditionelle C/EBP $\alpha$ <sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen einen selektiven Block in der Entwicklung der Reifungsphase der CMPs zu den GMPs<sup>128</sup>. C/EBP $\alpha$ -Gen-defiziente HSCs zeigen eine erhöhte Repopulationskapazität und das Knochenmark dieser gendefekttragenden Individuen weist einen hohen Anteil an myeloischen Vorläuferzellen auf, ähnlich dem Bild einer humanen AML. Unter den zahlreichen Genen, die durch C/EBP $\alpha$  reguliert werden, fand man einige, die für granuläre Proteine kodieren<sup>74</sup> und weitere, das granulozytäre Wachstum stimulierende Faktoren, wie den G-CSF-Rezeptor (G-CSF-R) und IL-6<sup>126, 127</sup>.

### 1.4.4 Die Rolle von C/EBP $\alpha$ in der Leukämogenese

Das Kennzeichen der AML ist ein Differenzierungsblock in einem Stadium früher Vorläuferzellen und die daraus folgende Akkumulation unreifer Blasten im Knochenmark. Unter den dysregulierten Genen bei der Entstehung akut myeloischer Leukämien zählen die Transkriptionsfaktoren zu den am weitest Häufigsten betroffenen<sup>112</sup>. Das gehäuft auftretende Fehlen der Expression von C/EBP $\alpha$  oder der Verlust seiner Funktionsfähigkeit in leukämischen Blasten einiger AML Subtypen lassen den Schluss zu, dass C/EBP $\alpha$  eine Tumorsuppressor Aktivität besitzt. In verschiedenen Translokationen, die in AML Subtypen zu finden sind, wies man verminderte Expressionen von C/EBP $\alpha$  nach. Das AML1-ETO Fusionsprotein, welches man in AML M2 Subtypen mit Translokation t(8;21) findet, inhibiert die C/EBP $\alpha$  mRNA Expression<sup>79</sup>. Desweiteren wurden Dysregulationen der C/EBP $\alpha$  Proteinexpression durch das PML-RAR $\alpha$  Fusionsprotein in AML M3 mit Translokation t(15;17) und in AML Sub-

typen mit FLT3-ITD Mutationen gefunden<sup>31,88</sup>. Eine supprimiert Expression von C/EBP $\alpha$  durch das BCR-ABL Onkoprotein konnte in chronisch myeloischen Leukämien detektiert werden<sup>82</sup>.

Mutationen im C/EBP $\alpha$  Gen selbst kommen in circa 9% aller Fälle akut myeloischer Leukämien vor<sup>80</sup>. Diese Mutationen sind entweder N-terminal lokalisierte Leserasterverschiebungen, sogenannte „frame-shift“ Mutationen, oder Punktmutationen in der C-terminalen bZIP Region. Erstere führen zur Bildung des zuvor erwähnten, im Vergleich zum Wildtyp Protein (C/EBP $\alpha$ -p42) verkürzten Translationsproduktes, C/EBP $\alpha$ -p30. Inzwischen weiß man, dass diese C/EBP $\alpha$ -p30 Mutante eine dominant-negative Aktivität gegenüber dem Wildtypprotein ausübt<sup>80</sup>. All die genannten Ergebnisse, teilweise auf Patientendaten, teilweise auf Experimenten mit transgenen Mäusen basierend, unterstreichen die zentrale Bedeutung einer Störung in der normalen Expression oder Funktion des C/EBP $\alpha$  Proteins bei der Entstehung akut myeloischer Leukämien<sup>96</sup>.

#### 1.4.5 C/EBP $\alpha$ und E2F1

Veröffentlichte Arbeiten der letzten Jahre werten die Inhibition von E2F1 durch C/EBP $\alpha$  als einen der kritischsten Schritte in der Granulopoese<sup>16,87,96</sup>. Die Familie der E2F Transkriptionsfaktoren lässt sich in 3 Subgruppen, basierend auf ihrer Sequenzhomologie, unterteilen: E2F1, E2F2 und E2F3 repräsentieren eine, E2F4 und E2F5 die zweite und E2F6 eine dritte Gruppe. Hier soll nur die erste Gruppe und dabei speziell E2F1 erläutert werden. Diese Gruppe von Transkriptionsfaktoren wird für die Progression des Zellzyklus benötigt. Das DNA-Bindungsmotiv der E2F Transkriptionsfaktoren ist die kanonische Sequenz ‚TTTSSCGC‘ (wobei S=C oder G), die in Promotoren vieler zellulärer Gene vorkommt, die für die Zellteilung und Proliferation benötigt werden<sup>19</sup>. Ihre Regulation erfolgt unter anderem durch das Retinoblastom-Protein (pRB), einem Tumorsuppressor Protein, das, abhängig von seinem Phosphorylierungszustand, E2F1 bindet und inhibiert oder sich von ihm löst und damit den Eintritt in die S-Phase fördert<sup>70,78</sup>. Seine Funktion übt das ‚gelöste‘ E2F1 Protein sowohl durch Transkriptionsaktivierung als auch durch eine repressive Wirkung auf die Transkription bestimmter Gene aus<sup>18,98,105</sup>. E2F1 hat neben seiner proliferationsstimulierenden Funktion, auch einen regulatorischen Einfluss auf die Apoptose. Abhängig von der relativen Konzentration des Proteins in der Zelle<sup>106</sup> und auch vom Vorhandensein weiterer, das Milieu beeinflussender Ereignisse werden apoptotische Abläufe entweder aktiviert oder inhibiert<sup>59</sup>. Interessanterweise liegt das E2F1 Gen selbst in Tumoren selten mutiert vor<sup>21</sup>, viel häufiger findet sich aber eine Störung seiner Regulation. Experimente ergaben, dass E2F1 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* onkogene Merkmale zeigt: seine Überexpression genügt um eine maligne Transformation von Vorläuferzellen zu induzieren und Tumoren in transgenen Mäusen mit reduzierter E2F1 Expression weisen eine langsamere Progression in der Tumorgenese auf als entsprechende Kontrollen<sup>50,122</sup>. Weitere *in vivo* Experimente mit transgenen Mäusen ergaben, dass es infolge einer deregulierten E2F1 Expression (unter Kontrolle eines Megakaryozyten-

spezifischen Promotors) zu einer Reifungsstörung megakaryozytärer Vorläuferzellen in der postmitotischen Phase kommen und dies zur Akkumulation anormaler unreifer Megakaryozyten führen kann<sup>32</sup>. Die Blockierung der terminalen Differenzierung von Interleukin-induzierbaren myeloischen Vorläuferzellen infolge unkontrollierter E2F1 Expression unterstreicht ebenfalls sein onkogenes Potential<sup>2</sup>. E2F1 ist außerdem ein Zielgen des Protoonkogens c-Myc, dessen Expression wiederum durch E2F1 im Sinne eines positiven ‚Feedback-Loops‘ induziert wird<sup>67</sup>. E2F1 fungiert in erster Linie als positiver Regulator seiner Zielgene, nichts desto trotz gibt es eine ganze Reihe von Beschreibungen einer negativ regulatorischen Funktion<sup>13,14,17,57</sup>. Der genaue Mechanismus für die Vermittlung der repressiven Wirkung ist derzeit noch immer nicht vollkommen geklärt, eine direkte Interaktion von E2F1 mit DNA-Bindungsmotiven scheint dabei aber eine Rolle zu spielen<sup>14,57</sup>.

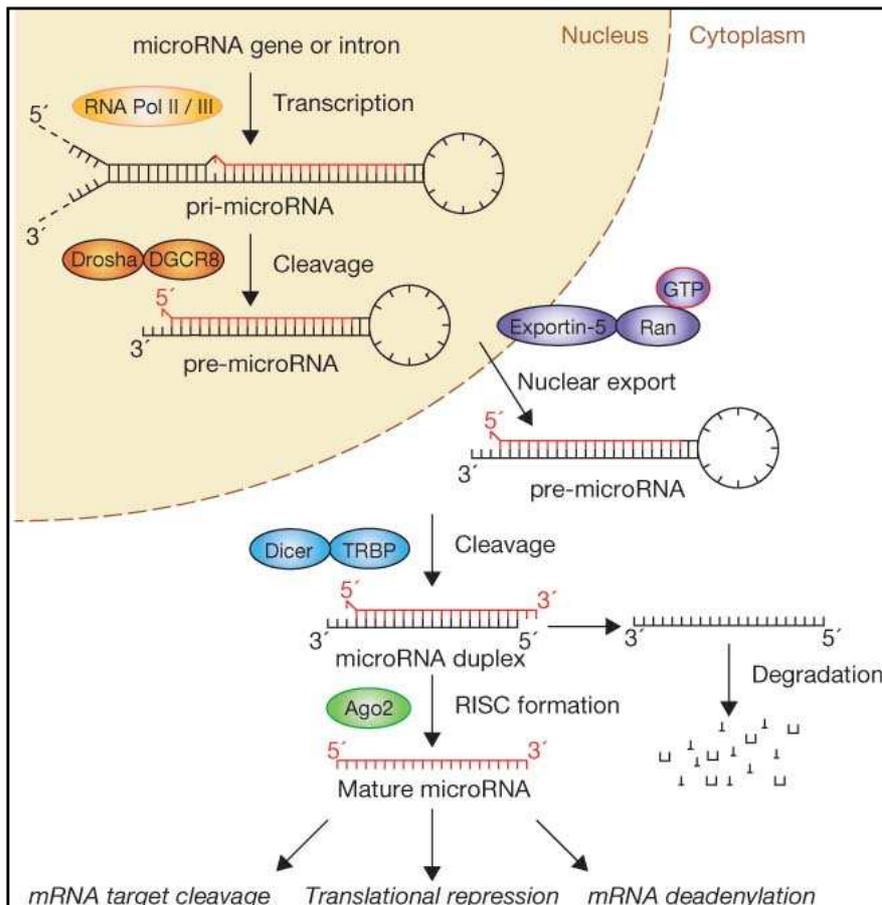
Von besonderer Bedeutung in der Regulation der E2F1 Expression und seiner Aktivität ist, dass C/EBP $\alpha$  in der Lage ist E2F1 zu inhibieren<sup>47,104</sup>. Die wichtige Bedeutung der Kontrolle der E2F1 Aktivität während der granulozytären Differenzierung wird durch Ergebnisse einer Arbeit deutlich, in der die Überexpression von E2F1 ausreichte, um die Differenzierung der entsprechenden Vorläuferzellenzellen zu blockieren<sup>87,107</sup>. Die wichtigen Domänen C/EBP $\alpha$ s, die essentiell für die Vermittlung der E2F1 Inhibition sind, identifizierte man sowohl im nicht-DNA bindenden C-terminalen, als auch im N-terminalen Bereich des Proteins. Ein Fehlen oder Vorhandensein von Mutationen in diesen Domänen, führt zu einem Ausbleiben der Hemmung von E2F1 und der Zellzyklus inhibierenden Funktion C/EBP $\alpha$ s und endet so in einer Blockierung der Granulopoese und Expansion der myeloischen Vorläuferzellen<sup>16,47,86,87</sup>. Die genauen Mechanismen C/EBP $\alpha$ s, die letztlich zur E2F Repression führen, sind nach wie vor nur teilweise geklärt. Einerseits weiß man von der Notwendigkeit einer direkten physiologischen Interaktion beider Proteine, die bei Mutationen des für C/EBP $\alpha$  codierenden Gens in der nicht-DNA-bindenden Region nicht zustande kommt. Andererseits sind Mutanten mit fehlenden N-terminalen TE I und II Regionen (C/EBP $\alpha$ -p30) zwar zu dieser Interaktion fähig, aber dennoch nicht in der Lage, E2F1 ausreichend zu inhibieren<sup>47,16</sup>. Es muss daher mindestens einen weiteren Mechanismus, neben dem der direkten Interaktion, geben, durch den C/EBP $\alpha$  die E2F1 Inhibition vermittelt und, der möglicherweise noch weitere, derzeit in diesem Zusammenspiel noch nicht identifizierte (Transkriptions-) Faktoren involviert. Unbestreitbar hingegen ist, dass die E2F1-Inhibition einen wichtigen und essentiellen Mechanismus C/EBP $\alpha$ s in seiner Funktion als Tumorsuppressor darstellt und, dass das Fehlen dieser Funktion eine wichtige Komponente im Prozess der leukämischen Transformation darstellt<sup>54</sup>.

## 1.5 microRNAs

Neben den lange bekannten Transkriptionsfaktoren stieß man kürzlich auf die Existenz einer neuen Klasse kleiner, nicht-Protein-kodierender RNAs, die ebenfalls als regulierende Faktoren wirken. Bei diesen sogenannten microRNAs (miRNAs) handelt es sich um einzelsträngige RNAs mit einer Länge von circa 22 Nukleotiden, die zahlreiche biologische Funktionen, wie die zelluläre Proliferation, die Differenzierung und die Apoptose beeinflussen, indem sie als translationale Inhibitoren spezifischer Zielgene wirken<sup>22</sup>. Inzwischen geht man davon aus, dass mindestens 300 miRNAs, was circa 1-4% aller exprimierter humaner Gene entspricht, im menschlichen Genom existieren, es könnten aber auch weit über 1000 sein<sup>6,22</sup>. Es wird angenommen, dass die miRNAs insgesamt etwa 30% aller Gene des menschlichen Genoms zu regulieren vermögen<sup>62</sup>. Ein zelltyp- und gewebespezifisches Expressionsmuster aufweisend, existieren meist mehr als 2000 Kopien dieser kleinen RNAs in einer Zelle, die dabei Zellwachstum und -differenzierung entscheidend beeinflussen und modulieren<sup>99</sup>.

### 1.5.1 Biogenese der miRNAs

Die Biogenese der miRNAs ist erst kürzlich genauer untersucht und geklärt worden<sup>4</sup> (Abb.4). Die Synthese einer miRNA beginnt initial mit der Bildung eines großen Primärtranskripts mit einer Länge von 500 bis 3000 Nukleotiden, der sogenannte pri-miRNA. Diese wird im Zellkern mit Hilfe der RNase III ‚Drosha‘ und dem Doppelstrang-RNA-bindenden Protein ‚Pasha‘, auch bekannt als DGCR8, weiterverarbeitet zu einer, aus etwa 70 Nukleotiden bestehenden pre-miRNA, die sich in einer Art Schleife zusammenlagert. Hier spricht man auch von einer sogenannten ‚stemloop‘ oder ‚hairpin structure‘<sup>22</sup>. Diese pre-miRNA wird dann mittels des RAN-GTP-abhängigen Exportin5 in das Zytoplasma transportiert. Dort erfolgt durch eine weitere RNase-ähnliche Nuklease ‚Dicer‘ die Bildung einer Duplex Struktur. Hierbei entspricht einer der beiden Stränge dieses Duplex den 20-24 Nukleotiden der späteren reifen miRNA<sup>103</sup>. Dieser Arm des Duplexes wird in einen sogenannten ‚RNA-induzierten Silencing-Komplex‘ (RISC) inkorporiert und bleibt dauerhaft mit diesem assoziiert um ihn zu den jeweiligen Ziel-mRNAs zu leiten und deren translationale Inhibition oder, in selteneren Fällen, deren direkten Abbau zu initiieren. Der zweite Arm hingegen wird mittels des zelleigenen Entsorgungsapparates in kürzester Zeit abgebaut.



**Abb. 3: Biogenese und Funktionsweise der microRNAs**

Quelle: Winter J et al., Nature Cell Biology, 2009

### 1.5.2 Funktionsweise der miRNAs

Die reife miRNA kann ihr jeweiliges Zielgen, abhängig vom Grad der Komplementarität zwischen der miRNA Sequenz und der Sequenz in der mRNA des Zielgens, auf zwei verschiedene Wege regulieren<sup>22</sup>. Die Erkennung eines Zielgens einer miRNA wird über eine kurze Sequenz von 2-8 Nukleotiden am 5' Ende der miRNA, die sogenannte ‚miRNA-seed‘, vermittelt<sup>63</sup>. Erfolgt die Bindung einer miRNA über diese essentielle Sequenz an ihre Ziel-mRNA mit unvollständiger Komplementarität, so führt dies zu einer Blockierung der Genexpression auf Ebene der Translation. Die komplementären Bindungssequenzen für miRNAs, die diesem beschriebenen Mechanismus folgen, befinden sich in der 3' untranslatierten Region (3'UTR; ‚3' untranslated region‘) der Ziel-mRNA. Infolge dieser translationalen Kontrolle führt die miRNA vermittelte Regulation in diesem Fall zu einer Reduktion der Proteinkonzentration des Zielgens, jedoch bleibt das mRNA Expressionslevel unbeeinflusst. Hingegen führt eine Bindung mit hoher Komplementarität zwischen miRNA und Ziel-mRNA zu einem direkten Abbau der betroffenen mRNA und somit zu einer Reduktion auf Protein und mRNA Ebene. Die Bindungssequenz für diesen Mechanismus befindet sich hier typischerweise in der Protein-kodierenden Region (ORF; ‚open reading frame‘) der Ziel-mRNA. Die miRNAs leiten den RISC zu den jeweiligen Zielgenen und

führen so zur Hemmung der Translation oder direkt zum Abbau der mRNA des Zielgens<sup>4</sup> (Abb.4). Im Tierreich hat sich der erstgenannte Mechanismus, der auf translationaler Ebene eingreift, als der stark dominierende herausgestellt, mit dem die miRNAs die negative Regulation ihres Zielgens ausüben<sup>35</sup>. Eine der wenigen, derzeit bekannten Ausnahmen hierfür ist die miRNA-196, für die der Mechanismus des direkten mRNA Abbaus vorherrscht<sup>123</sup>. Aufgrund der Tatsache, dass eine teilweise Komplementarität zwischen miRNA und Ziel-mRNA für die Interaktion ausreicht, kann eine einzige miRNA theoretisch eine riesige Zahl von Zielgenen regulieren und umgekehrt kann eine mRNA durch zahlreiche verschiedene miRNAs reguliert sein<sup>103</sup>.

### 1.5.3 miRNAs und Transkriptionsfaktoren

Der größte und wichtigste Anteil der Regulation der Zelldifferenzierung wurde lange Zeit zelllinienspezifischen Transkriptionsfaktoren zugesprochen. Interessanterweise stellen unter den derzeit vorhergesagten möglichen miRNA Zielgenen die Transkriptionsfaktoren eine überrepräsentierte Gruppe dar<sup>48,63</sup>. Einige Beispiele von miRNAs und ihren Zielgenen deuten auf eine durchaus wichtige Rolle der miRNAs als Regulatoren gewebespezifischer Transkriptionsfaktoren hin<sup>26,123,130</sup>. Unabhängig von dieser möglichen Funktion der miRNAs als inhibitorische Regulatoren von Transkriptionsfaktoren, lassen sich auch funktionelle Parallelen zwischen miRNAs und Transkriptionsfaktoren finden und Zusammenwirkungen in ihrer regulatorischen Funktion werden ebenfalls beschrieben<sup>40</sup>. Weitere Expressionsanalysen untermauern die Existenz von Netzwerken, nicht nur zwischen miRNAs, sondern auch Interaktionen zwischen den transkriptionsregulierenden Faktoren (TF) und den posttranskriptionell einflussnehmenden miRNAs<sup>101</sup>.

### 1.5.4 miRNAs in der Tumorgenese

Die Expression der miRNAs scheint auf sehr präzise Weise in den einzelnen Zelllinien während der unterschiedlichen Differenzierungs- und Proliferationsstadien reguliert zu sein. Diese Spezifität lässt sich auch bei maligner Entartung im Sinne tumorspezifischer miRNA-Expressionsmustern finden<sup>66</sup>. Lu et al. machten bei Untersuchungen verschiedener Tumorentitäten interessanterweise die Entdeckung, dass Vergleiche der miRNA-Expressionsmuster mit dem jeweils entsprechenden gesunden Gewebe häufig eine Herunterregulation verschiedener miRNAs aufwies<sup>66</sup>. Diese Muster könnten ein neuer Ansatz für die Definition und Klassifikation von Tumoren und ihren Subtypen sein<sup>69</sup>. Die starke Korrelation, die sich zwischen spezifischen miRNA Expressionsmustern und verschiedenen Tumoren finden lässt, erlaubt die Annahme, dass miRNAs eine Rolle in der malignen Transformation spielen und dabei als Onkogene oder Tumorsuppressoren wirken können<sup>22</sup>. Die verminderte oder der komplette Verlust der Expression einer miRNA mit tumorsupprimierender Wirkung sowie die Amplifikation und Überexpression einer als Onkogen fungierenden miRNA würden so eine Tumor-

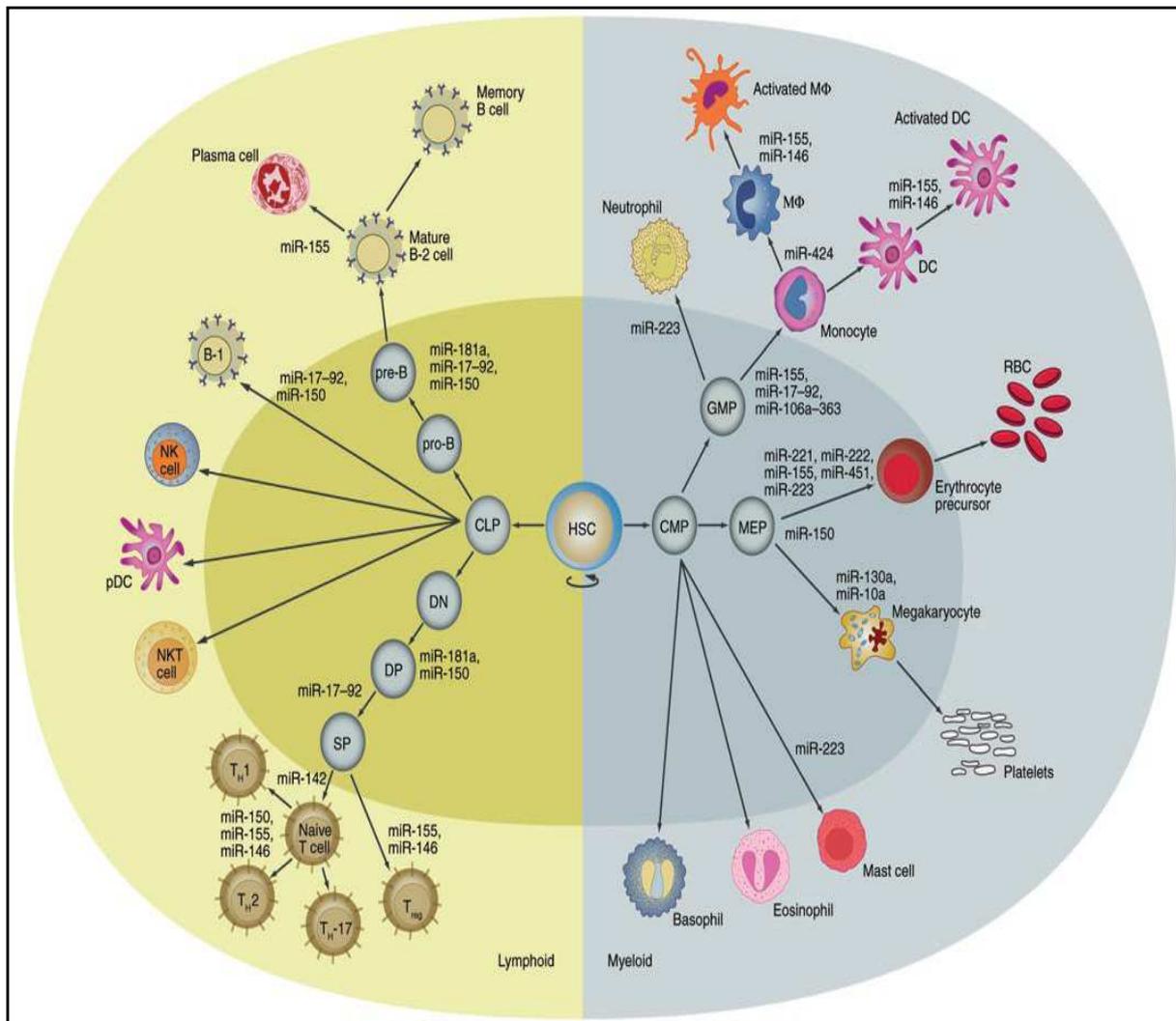
entstehung begünstigen. Einigen miRNAs konnte bereits eine Funktion als Tumorsuppressoren zugeordnet werden, so beispielsweise der miRNA-15a und miRNA-16-1. Diese miRNAs führen physiologischerweise zu einer negativen Regulation des antiapoptotisch wirkenden Gens BCL2, welches häufig in Tumoren unterschiedlichen Ursprungs, darunter auch Leukämien und Lymphome, stark überexprimiert vorhanden ist. Der Verlust der genannten miRNAs würde so durch das Fehlen der BCL2 Suppression zu einer stark erhöhten Expression dieses Proteins führen und folglich die maligne Entartung, entsprechend in hämatopoetischen Zellen die Leukämo- und Lymphogenese, fördern<sup>12,22</sup>. Insgesamt scheinen miRNAs allerdings nicht wie ‚klassische‘ Tumorsuppressoren zu wirken, welche typischerweise durch einen sogenannten ‚two-hit‘ Mechanismus komplett inaktiviert werden, sondern vielmehr manifestiert sich der Verlust der tumorsupprimierenden Funktion infolge der Unterschreitung eines kritischen Expressionslevels der spezifischen miRNA und führt zu einer extensiven Expression des onkogenen Zielgens<sup>129</sup>. Ein weiteres Beispiel einer das Tumorstadium inhibierenden miRNA ist die miRNA-17-5p, die Teil eines sogenannten miRNA-Clusters ist. Als eines der Zielgene dieser miRNA wurde in einer Zervixkarzinomzelllinie der proliferationsfördernde Transkriptionsfaktor E2F1 identifiziert<sup>74</sup>. Interessanterweise gibt es daneben Arbeiten, die dem gesamten miRNA-17-92-Cluster onkogene Wirkungen zusprechen und in denen man eine verstärkte Expression zugehöriger miRNAs in B-Zelllymphomen, in Lungen- und in Mammakarzinomen fand<sup>34,36,43,73</sup>. Für eine andere miRNA dieses Clusters, miRNA-20a, wurde neben der Regulation von E2F1, auch ein negativ regulatorischer Effekt auf E2F3 beobachtet<sup>108</sup>. Darüberhinaus wurde die Existenz eines autoregulatorischen ‚Feedback-Loops‘ zwischen diesem miRNA-Cluster und seinen Zielgenen entdeckt: E2F1, E2F2 und E2F3 bewirken durch direkte Interaktion mit dem Promotor des miRNA-Clusters die Aktivierung seiner Transkription. Die miRNA-34a ließ sich ebenfalls als einen Regulator von E2F1 identifizieren<sup>111</sup>. Diese unterschiedlichen Ergebnisse der Untersuchung einer einzelnen Gruppe von miRNAs lassen vermuten, dass die Funktion einer miRNA stark zelltyp- und gewebeabhängig ist und dass sich auch das Zielgenrepertoire einer miRNA von Gewebe zu Gewebe unterscheidet, so dass dieselbe miRNA sogar gegenteilige Zellaktivitäten, wie Proliferation und Differenzierung kontrolliert werden können.

### 1.5.5 miRNAs in der Hämatopoese

Die Expression einiger miRNAs ist spezifisch für Zellen des hämatopoetischen Systems. Eine solche Spezifität war zuerst bekannt für folgende miRNAs: miRNA-181, miRNA-142, miRNA-223<sup>11</sup>, sowie miRNA-221 und miRNA-222<sup>25</sup>. Ihre Expression unterliegt sowohl während der frühen Hämatopoese als auch in der folgenden linienspezifischen Differenzierung einer dynamischen Regulation. Eine hohe Expression der miRNA-181 wird vor allem in den CD34+ Vorläuferzellen des Knochenmarks und in T-Lymphozyten gefunden, wohingegen die miRNA-142 an sämtlichen Orten der Hämatopoese zu finden ist<sup>11,17</sup>. Die miRNA-223 wird vornehmlich im Knochenmark exprimiert, nicht jedoch in B-

und T-Lymphozyten. Im Knochenmark ist die miRNA-223 Expression vor allem in den CD34- Zellen zu finden, welche zu circa 75% myeloischen Zellen unterschiedlicher Stadien der neutrophilen Differenzierung entsprechen. Gemeinsam mit der gleichzeitig hohen Expression der miRNA-223 in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes, welches zu 50-70% aus reifen Granulozyten besteht, zeigt dies eine deutliche Assoziation der Expression dieser miRNA mit der Differenzierung dieser Zelllinie, also mit der Granulopoese<sup>24</sup>. Weitere Beispiele für miRNAs, die in der Hämatopoese eine Rolle spielen, sind die miRNA-150, die in die B-Zelldifferenzierung involviert ist, indem sie einen regulierenden Einfluss auf die c-Myb mRNA Expression hat<sup>120</sup> und die miRNA-155, die für die Funktion der T-Zellen von Bedeutung ist<sup>94</sup>.

Bei der Suche nach den für die humane Hämatopoese spezifischen miRNA-Expressionsmustern fand man eindeutige Unterschiede im Expressionslevel der miRNAs zwischen leukämischen Zelllinien und normalen Zellen. Diese Ergebnisse deuten auf eine Funktion dieser miRNAs in der Hämatopoese und auch auf eine mögliche Rolle während der malignen Transformation hin<sup>90</sup>.



**Abb. 4: Einfluss von miRNAs in der Hämatopoese und im Immunsystem**

Quelle: Baltimore D et al., Nature Review Immunology, 2008

### 1.5.6 miRNA-223

Die spezifische Expression der miRNA-223 während der Myelo- bzw. Granulopoese konnte sowohl im Mausmodell als auch in Experimenten mit humanen Zelllinien belegt werden <sup>11,24</sup>. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die miRNA-223 während der Behandlung myeloischer Vorläuferzellen mittels Retinolsäure zur Induktion der granulozytären Zelldifferenzierung hochreguliert wird. Desweiteren konnte die Überexpression der miRNA-223 selbst eine Induktion der Differenzierung unreifer Zellen der APL-Zelllinie (NB4) hervorrufen, während umgekehrt bei Blockierung dieser miRNA die Induktion der Differenzierung unterblieb <sup>24</sup>. Untersuchungen zur Regulation der miRNA-223 Expression zeigen verschiedene Mechanismen, deren jeweiliger Bedeutungsgrad derzeit nicht genau geklärt ist <sup>24,27</sup>. In einer Studie fand man zwei Transkriptionsfaktoren, C/EBP $\alpha$  und NFI-A, die um eine Bindungsstelle im Bereich der pre-miRNA-223 konkurrieren: dabei führt die Bindung von NFI-A zu einer geringen miRNA-223 Expression, wohingegen der Austausch gegen und die Bindung C/EBP $\alpha$ s während der Granulopoese zu einer starken Hochregulation des miRNA-223 Expressionslevels führt. Hinzu kommt ein negativer ‚Feedback-Loop‘: NFI-A, das selbst Zielgen der miRNA-223 ist und wird durch diese während der Differenzierung supprimiert. In diesem Schaltkreis, in den die miRNA-223 hier integriert ist, kommt ihr eine Schlüsselrolle im regulatorischen Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren, die die granulozytäre Differenzierung kontrollieren, zu <sup>24</sup>. Daneben charakterisiert eine andere Studie die miRNA-223 als ein ‚myelo-spezifisches Gen‘, das sowohl durch C/EBP $\beta$ , als auch durch den myeloischen Transkriptionsfaktor PU.1 reguliert werden kann <sup>27</sup>. In einer weiteren Arbeit, die sich ebenfalls mit der Regulation, aber auch mit der Störung der physiologischen miRNA-223 Expression in der Leukämogenese auseinandergesetzt hat, fand man eine epigenetische Regulation der miRNA-223 durch das Onkoprotein AML1/ETO, dass bei der Translokation t(8;21) zu finden ist <sup>23</sup>.

Weitere interessante Erkenntnisse über die Funktion der miRNA-223 ergaben Experimente mit miRNA-223-defizienten Mäusen <sup>49</sup>. Dabei konnte gezeigt werden, dass die miRNA-223 inhibierend auf die Proliferation myeloischer Vorläuferzellen wirkt. Die mutierten Mäuse, folglich mit einer Neutrophilie, weisen interessanterweise hypersensitive und -reaktive Granulozyten auf. Dies zeigt das Vorhandensein einer weiteren Funktion der miRNA-223 in der Regulation einer adäquaten Immunantwort <sup>49</sup>.

## 1.6 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der miRNA-223 als wichtigen regulatorischen Faktor zur Aufrechterhaltung der Balance zwischen Proliferation und Differenzierung genauer zu charakterisieren. Dies sollte durch Identifizierung eines neuen funktionellen Zielgens der miRNA-223 erfolgen. Spezielles Interesse bestand dabei in der Untersuchung, der Rolle der miRNA-223 in der Vermittlung inhibitorischer Funktionen von C/EBP $\alpha$ . Desweiteren sollte das Vorhandensein möglicher antiproliferativer Eigenschaften dieser miRNA geprüft werden. Darüberhinaus sollte untersucht werden, ob die miRNA-223 eine potentielle Tumorsuppressorfunktion besitzt und ihrer gestörte Expression somit eine Rolle in der Pathogenese akut myeloischer Leukämien, denen ein Differenzierungsblock und eine Regulationsstörung der Proliferation zugrunde liegt, zugeschrieben werden kann.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Reagenzien

**Tab. 3: Übersicht verwendeter Reagenzien**

<b>Material</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Acrylamid	Bio-Rad GmbH
Agar	Carl Roth GmbH
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	Carl Roth GmbH
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent	Bio-Rad GmbH
$\beta$ -Estradiol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Charcoal-treated Fetal Bovine Serum (CT-FBS)	HyClone, Peribo Science Europe
DMEM, RPMI 1640 (+/- Phenol Red)	PAA Laboratories GmbH, ATCC
dNTPs	Qiagen
ECL Westernblot Detektionsreagenzien	GE Healthcare Life science, Amersham Bioscience
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Carl Roth GmbH
Ethanol, Isopropanol, Methanol	Carl Roth GmbH
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco-Invitrogen; ATCC
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
GM-CSF	ImmunoTools GmbH
2 ME ( $\beta$ -Mercaptoethanol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
NaCl, HCl	Carl Roth GmbH
PBS (Phosphate buffered saline)	Gibco®
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Gibco®
Phosphatase-, Proteinase Inhibitor Cocktails	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Puromycin	MP Biomedicals
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH
Temed (Tetramethylethyldiamin)	Bio-Rad GmbH

### 2.1.2 Reaktionskits

**Tab. 4: Übersicht verwendeter Reaktionskits**

Material	Bezugsquelle
CD34 Progenitor Cell Isolation Kit, human	MACS® reagents, Milteny Biotec
Cell line Nucleofector Kit V	AMAXA biosystems
Dual Luciferase™ Reporter Assay Kit	Promega GmbH
Effectene Transfection Reagent™	Invitrogen™
HiSpeed™ Plasmid Purification Maxi Kit	Qiagen
ImProm-II™ Reverse Transcription System	Promega GmbH
Lipofectamin™ Reagent, Plus™ Reagent, Lipofectamin™ 2000	Invitrogen™
MACS® cell separation columns, MACS® Separator	MACS® reagents, Milteny Biotec
miRVana™ qRT-PCR miRNA Detection Kit	Ambion®
Quantifect SYBR Green PCR Kit	Qiagen
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene Europe
RNeasy Mini Kit	Qiagen
SYBR® Green-I nucleic acid stain	Invitrogen™

### 2.1.3 Enzyme und Marker

**Tab. 5: Übersicht verwendeter Enzyme und Marker**

Material	Bezugsquelle
Amersham Full-Range Rainbow™ Molecular Weight Markers	GE Healthcare Life science, Amersham Bioscience
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas GmbH
PfuTurbo DNA Polymerase	Stratagene Europe
Restriktionsenzyme	NewEngland BioLabs® Inc.
ROX Reference Dye	Invitrogen™
Supertaq™	Ambion®
T4-Ligase, 5X T4 DNA Ligase Buffer	Invitrogen™
Taq-Poymerase	Promega GmbH
TrackIt™ 10bp DNA Ladder	Invitrogen™

## 2.1.4 Plasmide, Oligonukleotide und Reporterkonstrukte

**Tab. 6: Übersicht verwendeter Plasmide, Oligonukleotide und Reporterkonstrukte**

C/EBP $\alpha$ (pcDNA)	Pabst T et al., 2001 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Tenen DG, Harvard Institutes of Medicine, Massachusetts, USA)
E2F1 (pCMV)	Johansen LM et al., 2001 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Tenen DG, Harvard Institutes of Medicine, Massachusetts, USA)
E2F1 wt (pcDNA3); E2F1 Eco132; E2F1 <sub>1-284</sub>	Davis JN et al., 2006 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Day LM, University of Michigan Ann Arbor, Michigan, USA)
miRIDIAN <sup>TM</sup> mimic-223, -control, siGLO Red	Dharmacon Research, Inc.
miRCURY <sup>TM</sup> -LNA-223, miRCURY <sup>TM</sup> -LNA-scramble, miRCURY <sup>TM</sup> -LNA-5'-FITC	Exiqon A/S
pGL3-basic-vector	Promega GmbH
223-vector	410bp der Pre-miRNA-223 zw. eine BamH-I und eine Hind-III Restriktionsseite in einen pSilencer <sup>TM</sup> 4.1-CMVpuro (Ambion) geklont
control-vector	55bp einer unspezifischen Sequenz in einem pSilencer <sup>TM</sup> 4.1-CMVpuro, vom Hersteller als Negative Kontrolle (Ambion)
pGL3-E2F1-3'UTR-wt	647bp der E2F1 3'UTR in die XbaI-Restriktionsseite des pGL3-Vektor (Promega) geklont (O'Donnell et al., 2006) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Mendell JT, Departments of Medicine, John Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA)
pGL3-E2F1-3'UTR-mut	3 Punktmutationen im pGL3-E2F1-3'UTR wt Vektor (647bp des E2F1 3'UTR) (O'Donnell et al., 2006) an Stelle 404 A $\rightarrow$ C, 406 T $\rightarrow$ C, 408 A $\rightarrow$ C
Ppri-miR-223-prom-1	DNA Fragment des Ppri-miRNA-223-Promotors (Fukao et al., 2007) von -1205bp bis +23bp relativ zur Transkriptionsstartseite der Ppri-miRNA-223 zwischen eine KpnI- und XhoI-Restriktionsseite eines pGL3 Basic Vektors (Promega) geklont
Ppri-miR-223-prom-2	DNA Fragment des miRNA-223 Promotors von -293bp bis +23bp relativ zur Transkriptionsstartseite der Ppri-miRNA-223 zwischen eine KpnI- und XhoI-Restriktionsseite eines pGL3 Basic Vektors (Promega) geklont (Fukao et al., 2007) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Fukao T, Departement of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engeneering, Tokyo, Japan)
Pre-miR-223-prom	DNA Fragment des Pre-miRNA-223-Promotors (Fazi et al., 2005) beginnend von -1500bp relativ zur pre-miRNA-223 Sequenz zwischen eine KpnI- und XhoI-Restriktionsseite eines pGL3 Basic Vektors (Promega) geklont
pCMV5	Kontroll- und Auffüllvektor
pRL0	pRL-SV40 Renilla Luciferase reporter vector (Promega)

### 2.1.5 Primer und Antikörper

**Tab. 7: Auflistung verwendeter Primer**

(Alle Primer wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, manuell designt und vom Hersteller Biomers bezogen.)

miRNA-223	RT- und PCR-Primer von Ambion (mirVana™ qRT-PCR-Primerset)
U6	RT- und PCR-Primer von Ambion (mirVana™ qRT-PCR-Primerset)
E2F1	FP 5'- GGG GAG AAG TCA CGC TAT GA -3' RP 5'- CTC AGG GCA CAG GAA AAC AT -3'
GAPDH	FP 5'- ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC -3' RP 5'- TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA -3'
G-CSF-R	FP 5'- AAG AGC CCC CTT ACC CAC TAC ACC ATC TT -3' RP 5'- TGC TGT GAG CTG GGT CTG GGA CAC TT -3'
M-CSF-R	FP 5'- ATT GTC AAG GGC AAT GCC CGC C -3' RP 5'- ATT GGT ATA GTC CCG CTC TCT CC -3'
223-vector	FP 5'- TAG GGA TCC ATT TTG CTC ACT TCC -3' RP 5'- GTA AGC TTA TGC CAC ACT TTT CCC -3'
Ppri-miR-223-prom-1	FP 5'- TAG GGT ACC TCA TTA GCC TGA AGG -3' RP 5'- GTC TCG AGG CAA ATG GAT ACC ATA C -3'
Pre-miR-223-prom	FP 5'- TAG GGT ACC GCT GAA TTG GGT AGG -3' RP 5'- GTC TCG AGC CAA GAG CTT CTG TGG -3'
E2F1 3'UTR mut	FP 5'- TGA GGG AGG GAG ACA GCC CGC CTG ACA GCC ATG-3' RP 5'- CAT GGC TGT CAG GCG GGC TGT CTC CCT CCC TC -3'

**Tab. 8: Auflistung verwendeter Antikörper**

(PE= Phycoerythrin, FITC= Fluorescein isothiocyanate)

<b>Primärantikörper</b>		
Anti-C/EBPα (SC-61)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
Anti- E2F1 (SC-193)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
Anti- E2F1 (SC-251)	Maus, polyklonal	Santa Cruz
Anti-β-Tubulin (SC-9104)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz

<b>Sekundärantikörper</b>		
Amersham ECL®-HRP-konjugiertes Anti-Kaninchen IgG	Esel, polyklonal	GE Health-care Life Science, Amersham

<b>FACS Antikörper</b>		
FITC- /PE-konjugierter anti-CD15-Antikörper	Maus IgM, $\kappa$	BD Pharmingen <sup>TM</sup>
PE-konjugierter anti-CD11b-Antikörper	Maus IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	BD Pharmingen <sup>TM</sup>
PE-konjugierter anti-CD14-Antikörper	Maus IgG <sub>2</sub> , $\kappa$	BD Pharmingen <sup>TM</sup>
PE-konjugierter anti-CD34-Antikörper	Maus IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	BD Pharmingen <sup>TM</sup>
FITC-bzw. PE-konjugierte IgM-Isotyp-Kontrolle	Maus IgM, $\kappa$	BD Pharmingen <sup>TM</sup>
PE-konjugierte IgG-Isotyp-Kontrollen	Maus IgG <sub>1</sub> , $\kappa$ ; Maus IgG <sub>2</sub> , $\kappa$	BD Pharmingen <sup>TM</sup>

### 2.1.6 Biologische Materialien

**Tab. 9: Auflistung verwendeter Bakterien**

<b>Bakterien:</b>	<b>bezogen von:</b>
Subcloning Efficiency <sup>TM</sup> DH5 $\alpha$	Invitrogen <sup>TM</sup>
Escherichia coli XL-1blue	Stratagene Europe

**Tab. 10: Auflistung verwendeter Zelllinien**

<b>Zelllinie:</b>	<b>Ursprung:</b>	<b>bezogen/erhalten von:</b>
Kasumi-6	humane akut myeloische Leukämiezellen (Myeloblasten, M2)	ATCC
K562-C/EBP $\alpha$ - p42ER, K562-ER	humane chron. myeloische Leukämiezellen mit Expression eines Fusionsproteins aus C/EBP $\alpha$ -p42 und Estradiolrezeptor oder einzig des Estradiolrezeptors	D'Alo F et al., 2003 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Tenen DG, Harvard Institutes)
U937	humane, histiozytische Lymphomazellen	ATCC
293T	humane, embryonale Nierenzellkarzinomzellen	ATCC

## Patientenproben

In insgesamt 18 AML-Proben wurde die miRNA-223 Expression analysiert. Hierzu wurde RNA aus verschiedenen Patientenproben extrahiert, die bei der Diagnosestellung aus Knochenmark (KM) oder peripherem Blut (PB) gewonnen worden waren. Die morphologische Diagnose wurde anhand der Kriterien der FAB-Klassifikation gestellt. Es handelte sich um Patienten mit de-novo-AML oder mit sekundärer AML nach geheiltem Primärmalignom. Eine Auflistung der verwendeten Proben sowie alle Details sind in Tab.12 (siehe 3.5) dargestellt. Der Karyotyp und vorhandene Mutationen wurden mittels zytogenetischer und molekularzytogenetischer Methoden bestimmt. Es handelte sich um jeweils 3 Proben folgender AML Subtypen: Translokation t(8;21), Translokation t(15;17), Komplexer Karyotyp (ck), Flt3-ITD, AML mit C/EBPA-Mutationen (CEBPA mut) und normaler Karyotyp (nk).

Alle Patientenproben, wurden mit dem Einverständnis der Patienten zur Verwendung des Materials zu Forschungszwecken, vom Labor für spezielle Leukämiediagnostik, Medizinische Klinik III, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München und vom ICP-Labor der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A, Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Münster erhalten.

### 2.1.7 Kulturmedien

**Tab. 11: Übersicht verwendeter Kulturmedien**

Zelllinie:	Medium:
K562-C/EBP $\alpha$ -p42ER, K562-ER	RPMI 1640 (ohne Phenol Red) + 10% FBS + 1% P/S + 1 $\mu$ g/ml Puro-mycin
Kasumi-6	Modifiziertes RPMI 1640 (10mM HEPES, 1mM sodium pyruvate, 4,5g/l Glucose, 1,5g/L sodium bicarbonate) + 20% FBS + 1% P/S + 1ng/ml GM-CSF
U937	RPMI 1640 + 10% FBS + 1% P/S
293T	DMEM + 10% FBS + 1% P/S

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

Die Kultivierung eukaryoter Zelllinien erfolgte nach Standardmethoden. Die Inkubation der Zellenerfolgte in Begasungsbrutschränken bei 37 °C, 96% relativer Feuchte und 5% CO<sub>2</sub>.

Nichtbenötigte Zellen wurden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und bei Bedarf aufgetaut. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die 1:1 mit Methylenblau verdünnte Zellsuspension auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und anschließend erfolgte die Auszählung der einzelnen Zählfelder.

### **2.2.2 RNA-Isolation**

Die RNA-Extraktion aus Zellen der verschiedenen Zelllinien erfolgte nach der bekannten Trizol® Methode. Für die RNA-Extraktion aus den AML-Proben wurde der RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Die RNA-Konzentration wurde anhand photometrischer Messungen bestimmt.

### **2.2.3 Reverse Transkription**

Mittels retroviraler Reverser Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, kann RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dies ermöglicht die PCR-Technik auch für die RNA-Analytik zu verwenden. Für die Reverse Transkriptase Reaktion wurde das ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) gemäß dem Herstellerprotokoll verwendet.

### **2.2.4 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion**

Die PCR ermöglicht die Amplifikation eines DNA-Fragments („Template“) über einen Bereich, der von zwei, dem Template komplementären Oligonukleotiden („Primer“) flankiert wird. Mittels einer temperaturstabilen DNA-Polymerase erfolgt in zyklischer Abfolge von Aufschmelzen (Denaturierung), Anlagerung der Primer („Annealing“) und folgender DNA-Polymerisation (Elongation) eine hochspezifische Vervielfältigung, selbst geringster Mengen vorhandener DNA. Die PCR wurde für verschiedene Experimente angewendet: zur RNA-Analyse, zur Klonierung sowie zur Mutagenese. Für Standardanwendungen und für Klonierungen wurde die Taq-DNA-Polymerase (Promega) verwendet, bei der Mutagenese die Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene). Für eine Standardreaktion wurden 50ng -500ng Template-DNA, je 10pmol Primer, je 10µM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1X Taq Polymerase Puffer (enthält u.a. MgCl<sub>2</sub> und schafft den für die Polymerase benötigten pH) und 2,5U DNA-Polymerase eingesetzt. Die PCR wurde in einem ThermoCycler (T Gradient Thermoblock, Biometra®) durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Reaktionsprodukte in einem 1%igem Agarosegel mit Ethidiumbromid zur Analyse und Visualisierung der amplifizierten Fragmente.

### 2.2.5 Real-time-Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Real-time-PCR (qRT-PCR) ermöglicht die zeitgleiche Amplifikation von Sequenzen und ihre quantitative Analyse. Das PCR-Produkt steigt während der Zyklen logarithmisch an, wie auch bei der qualitativen PCR, jedoch kann bei der Real-time-Methode die Ausgangskonzentration der Template-DNA errechnet werden kann. Für die Reaktionen wurde der Quantifect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) verwendet. Das SYBR Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an die doppelsträngige DNA bindet. Durch eine nach Ende jeder Elongationsphase erfolgende Messung seiner Fluoreszenz bei 530nm, die proportional zur DNA-Menge ist, kann der Anstieg des PCR-Produktes nach jedem Zyklus in Echtzeit beobachtet werden. Dem letzten PCR-Zyklus folgt eine Schmelzkurvenanalyse. Hierbei kann das PCR-Produkt anhand seiner spezifischen Schmelztemperatur, die sich aus der Zusammensetzung der Nukleotide ergibt, erkannt. Die Reaktion erfolgte in einem Rotor-Gene<sup>TM</sup> 3000, Real Time Thermal Cycler (Corbett Research). Zur Kontrolle diente die Analyse der Expression von U6 (miRNA-Experimente) oder des ‚Housekeeping-Gens‘ GAPDH (alle anderen Experimente). Da in der ersten Phase der Amplifikation die Templatemenge begrenzt und die Wahrscheinlichkeit, dass sich Template, Primer und Polymerase treffen, relativ gering ist, wohingegen während in der spätere Phase der Amplifikation die Menge der PCR-Produkte derart ansteigt, dass es zur Hemmung durch diese kommt, findet sich ein exponentieller und damit quantifizierbarer Anstieg der DNA-Amplifikation nur innerhalb der Phase dazwischen. Um, abhängig von der Templatemenge, immer am Anfang der exponentiellen Phase messen zu können, verwendet man einen sogenannte CT-Wert (Threshold Cycle = "Schwellenwert-Zyklus"). Dieser Wert beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Anhand des delta-delta-CT-Wertes wird die unterschiedliche Expression als n-fache Expression angegeben. Die CT-Werte werden hierbei einfach voneinander abgezogen ( $\Delta CT$ ), die beiden für einen Zeitpunkt erhaltenen  $\Delta CT$ -Werte der einzelnen Gruppen (z. B. mimic-223/ U6) voneinander abgezogen (z.B.  $\Delta \Delta CT = [CT(\text{mimic-223}) - CT(\text{U6})]_{\text{Test}} - [CT(\text{mimic-223}) - CT(\text{U6})]_{\text{Kontrolle}}$ ) und in die Gleichung  $n\text{-fache Expression (mimic-223 zu mimic-control)} = 2^{-\Delta \Delta CT}$  eingesetzt.

Für die Analyse der miRNA Expression erfolgten oben genannte Methoden unter Verwendung des miRVana<sup>TM</sup>-qRT-PCR-Kits und nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll (Ambion).

### 2.2.6 Transiente Transfektion eukaryoter Zellen

Das Einführen von DNA in eine eukaryote Zelle mit dem Ziel der vorübergehenden Expression eines Gens, wird als Transfektion bezeichnet. Mit Hilfe des Luziferase-Reportergens kann eine Quantifizierung der Genexpression erfolgen.

### **2.2.7 Transiente Transfektion von adhärenen Zellen mit Lipofectamin™ Reagent und von Suspensionszellen mit Lipofectamin™ 2000 oder Effectene™**

Die Lipofektion ist eine Methode der DNA Einschleusung in die Zelle mit Hilfe von Liposomen, die durch Fusion mit der Zellmembran den DNA Transport ins Zellinnere ermöglichen. Bei Experimenten in adhärenen Zellen (293T) wurden  $2 \times 10^4$  Zellen/0,5ml Medium je Vertiefung in 24-Lochplatten plattiert. Je Vertiefung wurden 0,62µg DNA pro Ansatz transfektiert. Die transfektierte DNA bestand dabei immer aus 0,02µg der internen Transfektionskontrolle pRL0 und 0,1µg des jeweiligen Luziferase-Reporterkonstrukts, sowie weiteren Expressionsvektoren der verschiedenen Transkriptionsfaktoren oder weiteren Oligonukleotiden („mimic“ Oligonukleotide, LNA). Die DNA Gesamtkonzentration wurde mittels des „Auffüllvektors“ pCMV5 in allen Konditionen konstant gehalten. Die Transfektion adhärenter Zellen mit der Lipofectamin erfolgte nach Herstellerangaben (Invitrogen).

Suspensionszellen wurden entweder mittels der Lipofectamin™ 2000 Methode oder mittels Effectene™ gemäß Herstellerangaben transfektiert. Zur Analyse der Transfektionseffizienz dieser Methode wurden die genannten Zellzahlen mit entsprechenden Konzentrationen von siGloRed™ als Indikator transfektiert.

### **2.2.8 Transiente Transfektion gelöster Zellen mit AMAXA**

Das Prinzip der Elektroporation eukaryotischer Zellen basiert auf der, durch einen elektrischen Impuls kurzzeitig, erhöhten Permeabilität der Zellmembran, die eine Diffusion von DNA in die Zelle ermöglicht. Diese Methode zeigt eine sehr hohe Effektivität bei der Transfektion von Suspensionszellen. Die Transfektion von  $1 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz erfolgte im AMAXA Elektroporationsgerät mittels eines zelllinienspezifischen Programms, das jeweils hinsichtlich seiner Höhe der Feldstärke und Dauer des Impulses für die entsprechende Zelllinie für den Transport der DNA nach intrazellulär optimiert wurde (V-01 für U937, T-03 für Kasumi-6 und K562-C/EBPα-p42ER Zellen). Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz dieser Methode wurden entsprechende Mengen eines GFP-Vektors für DNA-Konstrukte, FITC-markierter LNA für LNA Experimente, sowie des siGloRed™ Indikators für Experimente, in denen mimic Oligonukleotide verwendet wurden, transfektiert.

### **2.2.9 Dual-Luciferase™ Reporter-Assay**

Mittels sogenannter „Reportergenkonstrukte“ kann man spezifisch die Expression eines Gens nachweisen. Als Reportergene verwendet man vornehmlich Expressionskonstrukte, die für Proteine kodieren, die einfach und mit hoher Sensitivität nachzuweisen sind. Beim Luciferase-Assay, bei dem man sich das hochsensitiv nachweisbare Luciferase Enzym zu Nutze macht, können Faktoren, die die Expression eukaryoter Zellen beeinflussen, quantitativ analysiert werden. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der Messung der Photonen, die durch katalytische Oxidation des Luciferins entstehen,

mittels eines Luminometers. Beim Dual-Luciferase<sup>TM</sup> Reporter-Assay-System (Promega) kommen zwei verschiedene Luziferasen zur Anwendung: zum einen, die ‚Firefly Luziferase‘ (Photinus pyralis), die als Reporter im verwendeten Luziferase-Reporterkonstrukt vorhanden ist, und zum anderen die ‚Renilla Luziferase‘ (Renilla reniformis), die unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors steht und so bei Kotransfektion als Kontrollreporter dient. Die Aktivität des Luziferase-Reporterkonstrukts spiegelt die Wirkung der vorhandenen Faktoren auf die spezifische Genexpression wieder, während die des kotransfektierten Kontrollreporters eine interne Kontrolle darstellt, durch welche die gemessenen Werte normalisiert werden können (pRL0). Der Luziferase-Assay wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

#### **2.2.10 Proteinbestimmung mit dem Bio-Rad-Assay**

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte anhand des Bio-Rad-Assays nach Bradford mit photometrischer Messung der Absorption bei 595 nm. Aus BSA Lösungen bekannter Konzentration wurde eine Eichkurve erstellt, anhand derer mittels der gemessenen Werte dann die Proteinkonzentration der Probe bestimmt werden konnte.

#### **2.2.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Nach ihrer jeweiligen Molekülmasse lassen sich Proteine in einem Acrylamidgel auftrennen. Hierfür wurden vertikale Gelapparaturen mit einem niedrigprozentigen Sammelgel und einem darunterliegenden Trenngel verwendet. Die Polymerisation der Gele erfolgte durch Zugabe von APS und Temed. 30-50µg des Proteinlysats, das die zu trennenden Proteine enthielt wurden mit Ladepuffer versetzt und vor der Elektrophorese denaturiert. Nach Auftragung der Proteine sowie eines vorgefärbten Proteinstandards zur Molekulargewichtsabschätzung (Amersham Full-Range Rainbow<sup>TM</sup> Molecular Weight Markers) erfolgte deren Auftrennung durch Anlegung einer Spannung von 110 Volt für ca. 1h.

#### **2.2.12 Western Blot**

Beim Western Blot werden die in der SDS-Gel-Elektrophorese aufgetrennten Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und ihre Konzentration kann in semiquantitativer Weise bestimmt werden. Hierfür werden die Proteine zunächst elektrophoretisch vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran überführt und dabei fest an diese gebunden. Darauf folgt die Inkubation dieser Membran, zunächst mit spezifisch gegen die nachzuweisenden Proteine gerichteten Antikörpern und anschließend mit einem zweiten, gegen den konstanten Teil des ersten Antikörpers gerichteten Antikörper. Der zweite Antikörper ist mit Peroxidase gekoppelt (HRP-konjugiert), so dass nach Zugabe von Luminol bei dessen Oxidation eine Emission als Schwärzung auf einem Film gesehen werden kann. Hierdurch kann die Expression spezifischer Proteine sichtbar gemacht werden kann.

### 2.2.13 $\beta$ -Estradiol- und RA-Induktion

In der  $\beta$ -Estradiol-induzierbaren K562-C/EBP $\alpha$ -p42ER Zelllinie liegt das C/EBP $\alpha$ -Wildtypprotein mit dem Estradiolrezeptor fusioniert im Zytoplasma der Zellen vor. Durch Zugabe von 5 $\mu$ M  $\beta$ -Estradiol erfolgt die Translokation des Estradiolrezeptor-fusionierten C/EBP $\alpha$ -Wildtypproteins nach intranukleär und somit die Induktion zur Zelldifferenzierung. Die, das Fusionsprotein enthaltenden Zellen, wurden durch kontinuierliche Kultivierung mit Puromycin-enthaltendem Medium selektiert. Als Kontrollzelllinie diente die, den Estradiolrezeptor alleine tragende Zelllinie K562-ER. Bei der Induktion wurden jeweils 1x10<sup>6</sup> Zellen, die sich in 2ml Medium in 6-Lochplatten befanden, zu den gewünschten Zeitpunkten (0, 2, 4, 6, 12, 24h) mit 5 $\mu$ M  $\beta$ -Estradiol behandelt. Zur Kontrolle wurden Zellen mit einem entsprechendem Volumen 100% Ethanol, in welchem das  $\beta$ -Estradiol gelöst wurde, behandelt.

In U937 und Kasumi-6 Zellen kann die Differenzierung durch die Behandlung mit Retinolsäure (RA) induziert werden. Hierfür wurden ebenfalls 1x10<sup>6</sup> Zellen in 2ml Medium in 6-Lochplatten plattiert und zur Induktion mit jeweils 1 $\mu$ M RA behandelt. Zum Ausschluss unspezifischer Effekte durch das DMSO, worin die Retinolsäure gelöst war, wurde in einer Kontrolle ein entsprechendes Volumen DMSO zu den Zellen gegeben.

### 2.2.14 Gewinnung von Plasmiden

Die Transformation des Escherichia coli Stamms DH5 $\alpha$  mit Plasmiden erfolgte nach Protokoll des Herstellers (Invitrogen). Die Bakteriensuspension wurde auf Petrischalen mit ampicillinversetztem LB-Medium aufgetragen. Das Vorhandensein des Ampicillinasegens auf den zu transformierenden Plasmiden ermöglichte das selektive Wachstum der, das Plasmid enthaltenden und exprimierenden Kolonien.

Für die folgende Inokulation und Plasmid-Präparation wurden die auf Petrischalen ausplattierten E.coli Bakterien über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Kolonie mit einer Impföse entnommen und in 150ml ampicillinversetztem LB-Flüssigmedium für 12-16h bei 37°C und konstanten Schüttelbewegungen (200rpm) inkubiert. Zur Präparation der Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurde der HiSpeed<sup>TM</sup> Plasmid Purifikation Maxi Kit verwendet (Qiagen) und nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

### 2.2.15 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch durch die Absorptionsmessung und Berechnung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm und 280nm. Der A260/A280 Quotient für ausreichend reine DNA und RNA Präparationen liegt bei 1,8 +/- 0,2.

### **2.2.16 Klonierung**

Unter dem Klonieren versteht man die Einführung eines gewünschten DNA-Fragments in einen Vektor dessen Expression so die massenhafte Vermehrung dieser DNA ermöglicht. Zur Herstellung solcher Konstrukte wurden das gewünschte, mittels PCR hergestellte DNA-Fragment und der gewünschte Vektor mit Restriktionsenzymen, nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs), verdaut. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Detektion des gewünschten DNA-Fragments im Agarosegel wurde dieses ausgeschnitten und mittels QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Die Ligation des Fragments in Vektor-DNA erfolgte mit T4-Ligase (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers.. Daraufhin erfolgte die Transformation kompetenter Zellen mit dem Reaktionsansatz (s.2.2.15). Die erfolgreiche Herstellung eines gewünschten Konstrukts wurde durch eine Sequenzierung der Plasmidpräparation überprüft.

### **2.2.17 In-vitro-Mutagenese**

Mittels spezifischer Primer, in deren Sequenz eine Base entsprechend der gewünschten Mutation innerhalb des DNA-Fragments gegen eine andere ausgetauscht wurde, kann gezielt eine Punktmutation in einen Vektor eingeführt werden. Die Mutation des E2F1 3'UTR wt Vektors (647bp der E2F1 3'UTR in der Xba-I Restriktionsseite eines pGL3 Vektors von Promega; O'Donnell et al., 2006) wurde in einem PCR-basierten Verfahren unter Verwendung des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA) durchgeführt. Hierbei wurden 3 Punktmutationen durch Basenaustausch (in der spezifischen Bindungssequenz mit der miRNA-223) eingefügt. Die Arbeitsschritte wurden den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Die korrekte Sequenz des mutierten Vektors (pGL3 E2F1 3'UTR mut) wurde durch Sequenzierung bestätigt.

### **2.2.18 Durchflusszytometrie**

Die Detektion von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie wurde verwendet um die Expression spezifischer Proteine während der Zelldifferenzierung (cluster of differentiation, z.B. die CD15) zu quantifizieren. Hierbei macht man sich die spezifische Bindung von Antikörpern, die gegen, an der Zelloberfläche exprimierte Proteine gerichtet sind, zu Nutze. Nach Inkubation mit den FITC- oder PE-markierten Antikörpern wurden die Zellen im BD FACSCalibur Durchflusszytometer (BD Pharmingen™) gemessen (FACS-Analyse). Die Messdaten wurden mit der Cellquest-Software (BD) ausgewertet.

### **2.2.19 Zellzyklus Analyse**

Die Zellproliferation erfolgt durch geregelten Phasendurchlauf des Zellzyklus. Man unterscheidet dabei zwischen G<sub>0</sub>-, G<sub>1</sub>-, S- und G<sub>2</sub>/M-Phase. Bei der Zellzyklus-Analyse handelt es sich um eine Methode, bei der anhand des DNA-Gehalts von Zellen festgestellt werden kann, in welcher Phase des Zellzyklus sich diese Zellen befinden. Die DNA in den Zellen wird hierfür mit dem DNA-bindenden Farbstoff Propidiumiodid (PI) markiert und kann so gemessen werden. Auf der gemessenen DNA-Menge basierend kann dann die Zuordnung der Zellen in die einzelnen Zellzyklusphasen mittels FACS-Analyse erfolgen.

### **2.2.20 Statistik**

Für die statistische Auswertung sämtlicher Ergebnisse der durchgeführten Experimente wurde der student-t-Test für abhängige und unverbundene Stichproben verwendet (Excel, Microsoft, USA). Unterschiede mit  $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$  (\* bzw. \*\*) als entsprechende Markierung in den Abbildungen) wurden als statistisch signifikant gewertet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 C/EBP $\alpha$ induziert die miRNA-223 Expression

Die Expression der miRNA-223 wird durch C/EBP $\alpha$  hochreguliert (Abb.5a). Der Transkriptionsfaktor C/EBP $\alpha$  konnte bereits als ein wichtiger, die Expression der miRNA-223 induzierender Regulator identifiziert werden. Dies erfolgte allerdings bislang nur indirekt, nämlich durch Induktion von NB-4 Zellen (APL Zelllinie) mit Retinolsäure (RA), welches bekannterweise, neben der Aktivierung anderer Faktoren, auch zu einer C/EBP $\alpha$  Induktion führt<sup>89</sup>. Um die Regulation der miRNA-223 durch C/EBP $\alpha$  direkt zu verifizieren, wurde die Zelllinie K562-C/EBP $\alpha$ -p42ER verwendet. Bei Behandlung dieser speziell modifizierten Zellen mit  $\beta$ -Estradiol wird das C/EBP $\alpha$  Protein, welches fusioniert mit dem Estradiolrezeptor im Zytoplasma dieser Zellen vorliegt, in den Zellkern translokalisiert. Dort dann aktiv vorliegend kann das C/EBP $\alpha$  Protein seine transaktivierende Funktion ausführen und induziert dabei die granulozytäre Differenzierung der Zellen. Die Verifizierung dieses Modells erfolgte einerseits durch Analyse der unterschiedlichen Expression des granulozytenspezifischen Oberflächenproteins CD11b in unbehandelten und in 48h mit  $\beta$ -Estradiol behandelten K562-C/EBP $\alpha$ -p42ER Zellen, sowie andererseits durch Vergleich mit der CD11b Expression in K562-ER Zellen (Kontrollzelllinie) die ebenfalls teils unbehandelt, teils entsprechend mit  $\beta$ -Estradiol behandelt waren (Abb.6a). Zusätzlich erfolgte der Nachweis der  $\beta$ -Estradiol induzierten Translokation des C/EBP $\alpha$ -Estradiolrezeptor-Fusionsproteins durch separate Isolation der Proteine des Zytoplasmas und des Zellkerns in beiden Zelllinien. Die anschließende Western Blot Analyse bestätigte die regelrechte Funktion des beschriebenen Modells (Abb.6b). Für die Untersuchung der durch C/EBP $\alpha$  induzierten miRNA-223 Expression wurden die K562-C/EBP $\alpha$ -p42ER Zellen nach unterschiedlicher Dauer der  $\beta$ -Estradiol Behandlung hinsichtlich ihres miRNA-223 Expressionslevels analysiert. Dabei zeigte sich ein rascher Anstieg der miRNA-223 Expression bereits nach 2-, 4- und 6-stündiger Induktion auf das 6-9 fache des Ausgangswertes (Abb.5a). Als Kontrolle diente die K562-ER Zelllinie, die kein Fusionsprotein trägt. Die entsprechende Behandlung dieser Zellen und anschließende Analyse des miRNA-223 Expressionslevels zeigte keine signifikante Veränderung (Abb.5b).

C/EBP $\alpha$  ist in der Lage die miRNA-223 Expression zu induzieren. Die Tatsache, dass dieser beobachtete Effekt, der aufgrund des verwendeten *in vitro* Modells direkt und ausschließlich auf eine C/EBP $\alpha$ -spezifische Funktion zurückzuführen ist, so dramatisch war und die Tatsache beachtend, dass C/EBP $\alpha$  als ‚Master-Regulator‘ der Granulopoese angesehen wird, lässt eine wichtige Bedeutung dieser miRNA-223 Expressionsinduktion während der Granulopoese annehmen.

Abb.5

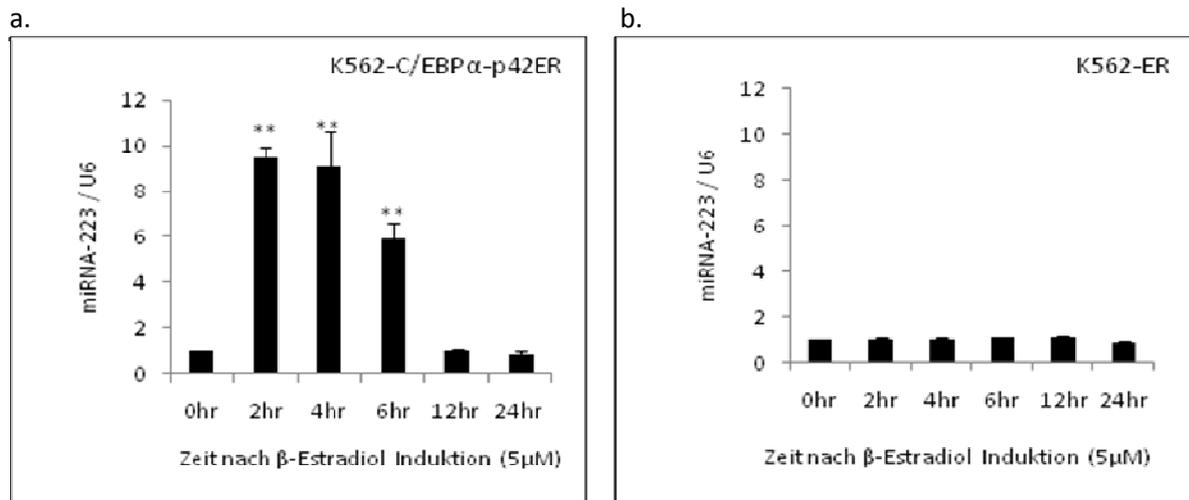


Abb. 5: Die Induktion der miRNA-223 Expression durch C/EBPα

Die Zellen wurden für die angegebenen Stunden in der Anwesenheit von 5μM β-Estradiol kultiviert.

a. Nach RNA-Isolation aus K562-C/EBPα-p42ER Zellen und RT erfolgte die Analyse mittels qRT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer für die miRNA-223, sowie für U6 als Kontrolle. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung des miRNA-223/U6 Verhältnisses von drei unabhängigen Experimenten. (\*\* p < 0,01)

b. Zellen der K562-ER dienten als Kontrolle. Nach RNA-Isolation und RT erfolgte die Analyse mittels qRT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer für die miRNA-223 und für U6 als Kontrolle. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung des miRNA-223/U6 Verhältnisses von drei unabhängigen Experimenten.

Abb.6

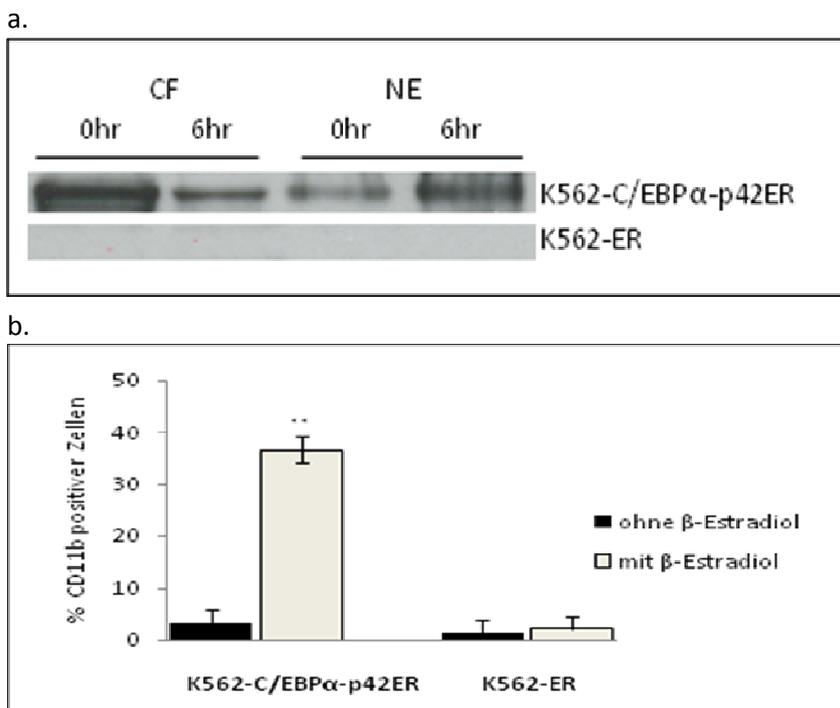


Abb. 6: Induktion der Differenzierung in der K562-C/EBPα-p42ER Zelllinie

a. Zytosolische (CF, cytoplasmic fraction) und nukleäre (NE, nuclear extract) Proteine wurden aus K562-C/EBP $\alpha$ -p42ER und K562-ER Zellen ohne und mit Translokationssignal (5 $\mu$ M  $\beta$ -Estradiol) gewonnen. Anschließend wurden die Proteinfractionen mittels Western Blot Verfahren analysiert.

b. K562-C/EBP $\alpha$ -p42ER und K562-ER Zellen wurden für 48h mit 5 $\mu$ M  $\beta$ -Estradiol behandelt und anschließend erfolgte die Analyse des Differenzierungsstatus mittels FACS-Analyse der Oberflächenproteinexpression von CD15 und CD14. (\*\* p < 0,01)

### 3.2 E2F1 ist ein funktionelles Zielgen der miRNA-223

MicroRNAs üben ihren regulativen Einfluss bei Säugetieren auf posttranskriptioneller Ebene aus und führen vornehmlich zur Inhibition der Translation ihrer Ziel-mRNA<sup>35</sup>. Dies bedeutet, dass das Zielgen einer miRNA durch deren inhibitorische Aktivität eine Reduktion seiner Expression auf Proteinebene zeigt, gleichzeitig aber sein mRNA-Expressionslevel unbeeinträchtigt bleibt. Diese Konstellation einer Reduktion auf Proteinebene und unverändertem mRNA-Expressionslevel stellt somit das typische Kennzeichen einer miRNA-regulierten Genexpression dar.

Unter den hunderten von bioinformatisch ermittelten, potentiellen Zielgenen der miRNA-223 konnte in der Myelopoese der Transkriptionsfaktor NFI-A als ein tatsächlich durch diese miRNA reguliertes Gen nachgewiesen werden<sup>24</sup>. Grundlage für das Postulat einer mRNA als potentielles Zielgen einer miRNA ist das Vorhandensein einer gewissen Komplementarität einer kurzen Sequenz in der 3'UTR der mRNA des fraglichen Zielgens zur miRNA-,seed', einer 5'-gelegenen, aus 8-10 Nukleotiden bestehenden Sequenz, die die eigentliche Funktion der miRNA vermittelt. Dabei kommen, aufgrund der nicht notwendigen vollständigen Komplementarität, jeweils zahlreiche Gene als Zielgene einer miRNA in Frage. Unter solchen potentiellen Zielgenen der miRNA-223 war besonders der Transkriptionsfaktor E2F1 ein sehr interessanter Kandidat, da er in die Regulation der Balance von Differenzierung und Proliferation involviert ist und, da seine Inhibition speziell während der Granulopoese von großer Bedeutung ist. Darüberhinaus gilt diese Inhibition desweitern als eine der wichtigsten durch C/EBP $\alpha$  vermittelten den Zellzyklus regulierenden Funktionen.

Um herauszufinden, ob es sich bei E2F1 tatsächlich um ein Zielgen der miRNA-223 handelt, wurden zunächst die oben genannten typischen Kennzeichen einer miRNA-regulierten Genexpression untersucht. Das heißt, es erfolgte zunächst die Analyse der Veränderungen im Protein- und mRNA-Level von E2F1 infolge einer Induktion der miRNA-223 Expression. Hierfür wurde das oben beschriebene *in vitro* Modell der K562-C/EBP $\alpha$ -p42ER Zelllinie verwendet. Dabei konnte bei C/EBP $\alpha$ -induzierter miRNA-223 Expressionssteigerung eine Reduktion des E2F1 Proteinlevels mit einem Maximum nach 2-6h nachgewiesen werden (Abb.7a). Gleichzeitig blieb die mRNA-Expression von E2F1 unbeeinträchtigt (Abb.7b). Dies war ein erster Hinweis auf eine mögliche Involvierung dieser miRNA in die posttrans-

kriptionelle Regulation von E2F1. Als Kontrolle diente die K562-ER Zelllinie, in der sich keine Veränderung der E2F1 Expression zeigte (Abb.7c und d).

Da es sich aber hier nur um einen indirekten Nachweis einer miRNA-223 medierten Funktion handelte, wurden die Folgen einer direkten Überexpression der miRNA-223 untersucht. Dies erfolgte mittels transienter Transfektion myeloischer U937 Zellen mit miRNA-223 sequenzidentischen Oligonukleotiden (mimic-223). Analysen der Ergebnisse dieser Experimente zeigten eine circa 70% Reduktion des E2F1 Proteinlevels ohne Effekt auf das mRNA Level bei Vergleich der mimic-223 transfektierten Zellen mit Zellen, die mit Kontroll-Oligonukleotiden einer unspezifischen Sequenz (mimic-control) transfektiert worden waren (Abb.7e und f). Umgekehrt fehlte diese zuvor beobachtete E2F1 Inhibition bei  $\beta$ -Estradiol Induktion der Zellen und gleichzeitiger Transfektion dieser mit inhibierenden Oligonukleotiden, die eine spezifische Blockierung der miRNA-223 (LNA-223) herbeiführen (Abb.7g). Es zeigte sich sogar ein leichter Anstieg des endogenen E2F1 Proteinlevels im Vergleich zu Kontroll-LNA transfektierten Zellen (LNA-control). Ohne die Anwesenheit einer funktionsfähigen miRNA-223 unterblieb also die beobachtete Reduktion des E2F1 Proteinlevels, die zuvor bei Induktion der granulozytären Differenzierung aufgetreten war.

Bei genauerer Untersuchung der 3' untranslatierten Region (3'UTR) von E2F1 ließ sich eine kurze Sequenz ermitteln, die eine inkomplette Komplementarität zur 5'-gelegenen ‚seed‘-Sequenz der miRNA-223 aufweist. Dies erfüllt die notwendige Voraussetzung der Existenz einer direkten regulativen Wirkung der miRNA-223 auf den E2F1 Transkriptionsfaktor (Abb.7h). Bei Untersuchungen der 3'UTR der E2F1 mRNA in Maus und Ratte zeigte sich interessanterweise, dass die in der humanen 3' gelegenen Region gefundene potentielle Bindungssequenz für die miRNA-223 auch hier vorhanden ist. Diese spezifische Sequenz scheint also über verschiedene Spezies hinweg konserviert zu sein (Abb.7i).

Um die E2F1 mRNA als mögliches miRNA-223 Zielgen weiter zu untersuchen und, um die Bedeutung der gefundenen Sequenz in der 3'UTR von E2F1 für den Mechanismus der negativen Regulation durch die miRNA-223 zu verifizieren, wurde ein modifizierter Luziferase-Assay durchgeführt. Dieser gilt heutzutage als klassischer Ansatz zur Identifizierung von miRNA-Zielgenen. Dabei wird ein Luziferase-Reporterkonstrukt verwendet, das einen Teil der 3'UTR mit der potentiellen miRNA-Bindungssequenz hinter eine Luziferase-Gen codierende Region geklont, enthält. Die negativ regulatorische Wirkung einer miRNA, die tatsächlich über diese vorhandene potentielle Sequenz in der 3'UTR vermittelt wird, spiegelt sich dabei in einer Reduktion der Luziferaseaktivität bei Anwesenheit der entsprechenden miRNA wieder. In der vorliegenden Arbeit wurde also ein Vektor verwendet, der einen Teil der 3' UTR der E2F1 mRNA mit der potentiellen miRNA-223-Bindungsstelle enthält (pGL3-E2F1-3'UTR wt, Abb.7h). Desweiteren wurde ein, insgesamt drei Punktmutationen in der für die miRNA-223 dienenden Bindungssequenz enthaltendes zweites Konstrukt hergestellt. Dieses diente

als Indikator der Spezifität der gefundenen Sequenz für die miRNA-223 medierte translationale Inhibition (pGL3-E2F1-3'UTR mut, Abb.7h). Diese verschiedenen Luziferase-Reporterkonstrukte wurden jeweils gemeinsam mit miRNA-223 sequenzidentischen Oligonukleotiden (mimic-223) oder Kontroll-Oligonukleotiden (mimic-control) in 293T Zellen transfektiert. Die Ergebnisse zeigten einen negativen Effekt der miRNA-223 auf die Luziferaseaktivität des pGL3-E2F1-3'UTR wt Konstrukts (Abb.7j). Die miRNA-223 führte dabei zu einer Reduktion der Luziferaseaktivität auf ca. 60% des Ausgangswertes, der bei alleiniger Transfektion des Luziferase-Reporterkonstrukts vorhanden war (Abb.7j, 2.Balken). Im Gegensatz hierzu ließ sich bei Experimenten mit dem mutierten Konstrukt, das Punktmutationen in der, für die miRNA-223 dienenden Bindungssequenz enthielt, kein Effekt beobachten (Abb.7k, 2.Balken). Zur Kontrolle wurden Zellen mit Oligonukleotiden einer unspezifischen Sequenz transfektiert (mimic-control). Die Transfektion dieser Kontroll-Oligonukleotide zeigte weder beim Wildtyp Luziferase-Reporterkonstrukt, noch bei der Mutante einen signifikanten Einfluss auf die Luziferaseaktivität (Abb.7j und k, jeweils 3.Balken).

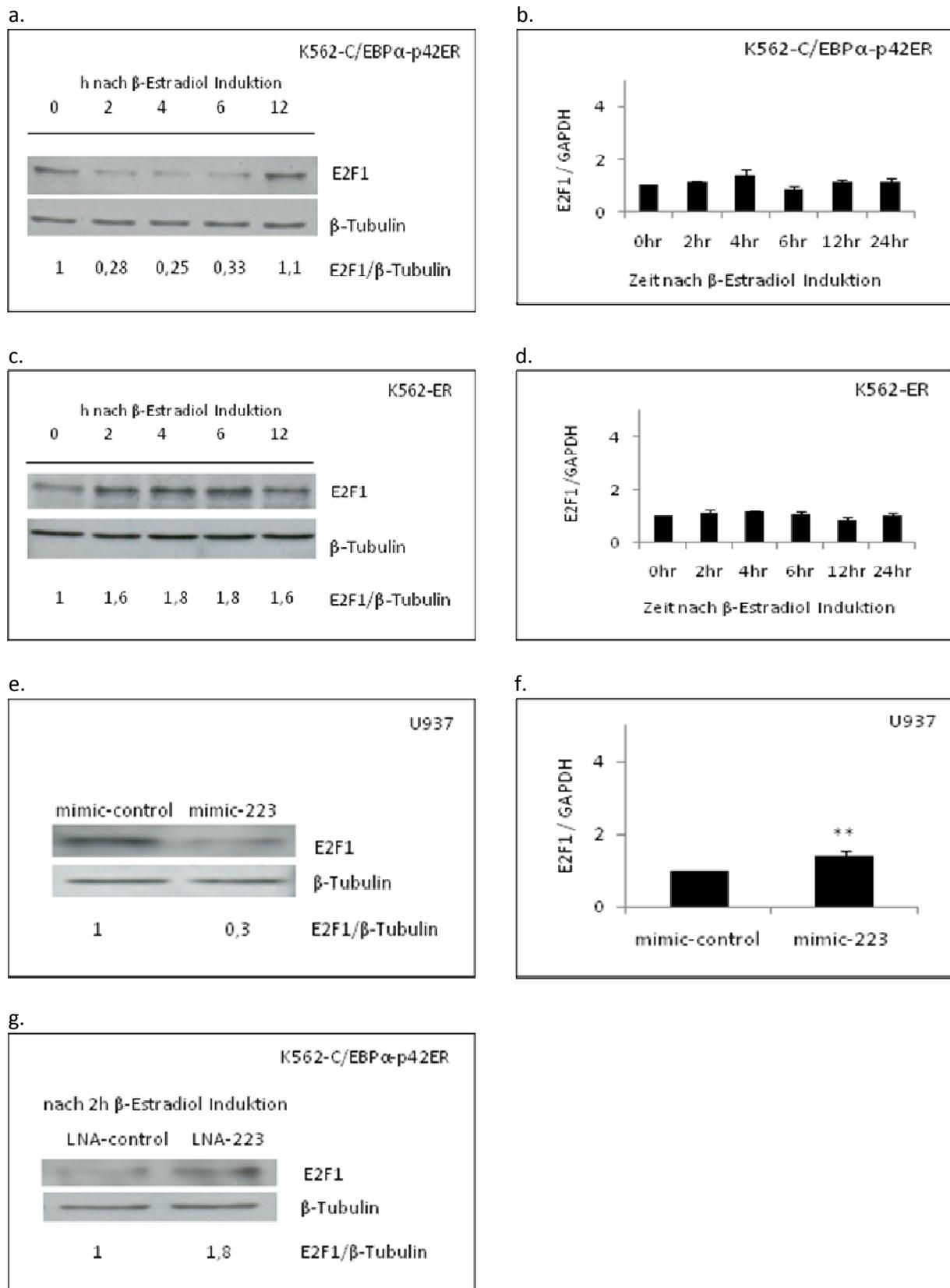
Bei der Transfektion von myeloischen U937 Zellen mit dem pGL3-E2F1-3'UTR wt Konstrukt und einer zeitgleichen Blockierung der endogenen miRNA-223 Expression mittels ko-transfektierter LNA-223 zeigte sich eine deutlich stärkere Luziferaseaktivität verglichen mit Kontroll-LNA transfektierten Zellen (LNA-control) (Abb.7l). Bei Blockierung der endogenen miRNA-223 Aktivität fehlte also der inhibitorische Einfluss auf die E2F1 Translation.

Da, wie zuvor gezeigt, die Expression der miRNA-223 durch C/EBP $\alpha$  induziert werden kann (Abb.5a) und aufgrund der neuen Kenntnis der Existenz einer negativen Regulation des Transkriptionsfaktors E2F1 durch die miRNA-223, wurde auch der Effekt C/EBP $\alpha$ s auf die translationale Regulation analysiert. Ein inhibitorischer Effekt auf das pGL3-E2F1-3'UTR wt Konstrukt, konnte auch hier bei Transfektion der 293T Zellen mit einem C/EBP $\alpha$ -exprimierenden Vektor, beobachtet werden (Abb.8a). Genau wie zuvor in Experimenten mit mimic-223 verschwand dieser Effekt aber auch hier, bei Vorhandensein einer Mutation in der potentiellen Bindungssequenz für die miRNA-223 (pGL3-E2F1-3'UTR mut) (Abb.8b). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass C/EBP $\alpha$  einen gewissen Teil seiner E2F1-inhibierenden Funktion durch die Induktion und Aktivierung der miRNA-223 vermittelt. Natürlich kann hier aber nicht ausgeschlossen werden, dass weitere C/EBP $\alpha$  induzierte miRNAs in diesen Mechanismus involviert sind. Hierfür spräche auch die Tatsache, dass der bei Anwesenheit C/EBP $\alpha$ s beobachtete negative Effekt noch stärker war, als die erreichte Reduktion der Luziferaseaktivität bei direkter miRNA-223 Überexpression (vgl. Abb.7j und Abb.8a).

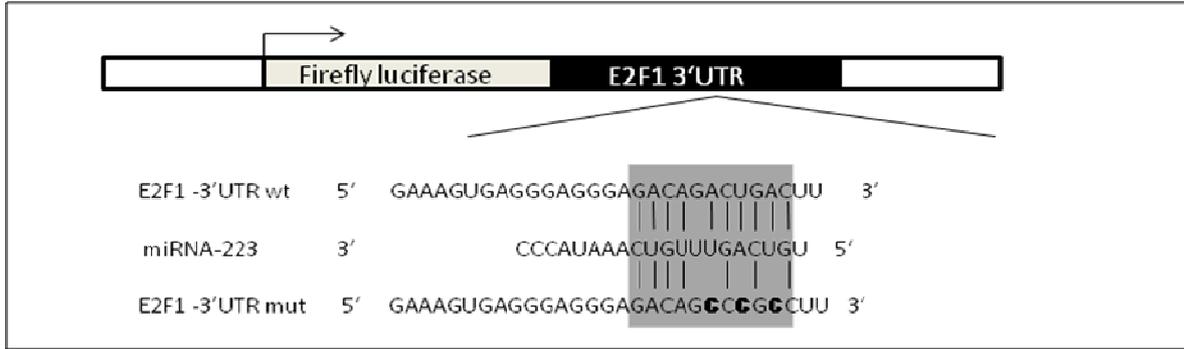
Aus all diesen Ergebnissen lässt sich zusammenfassen, dass E2F1 ein Zielgen der miRNA-223 ist und von dieser auf translationaler Ebene negativ reguliert wird. Bei dem zugrundeliegenden Mechanismus handelt es sich um eine direkte Interaktion der 5'-gelegenen ‚seed‘-Sequenz der miRNA-223 mit einer spezifischen unvollständig komplementären Bindungssequenz in der 3'UTR von E2F1. Die Tat-

sache, dass die Region in der 3'UTR von E2F1 über verschiedene Spezies konserviert ist, lässt diesen Mechanismus der Regulation von E2F1 durch die miRNA-223 ebenfalls wichtig erscheinen.

**Abb.7**



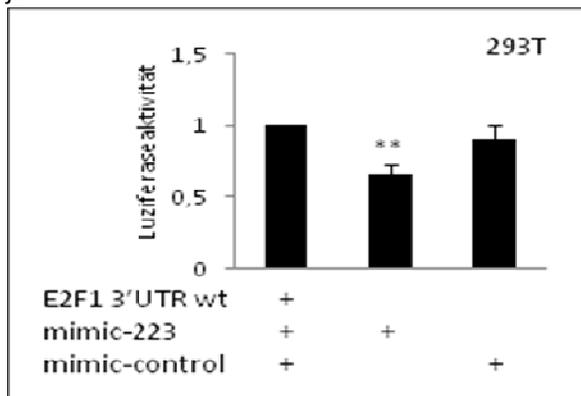
h.



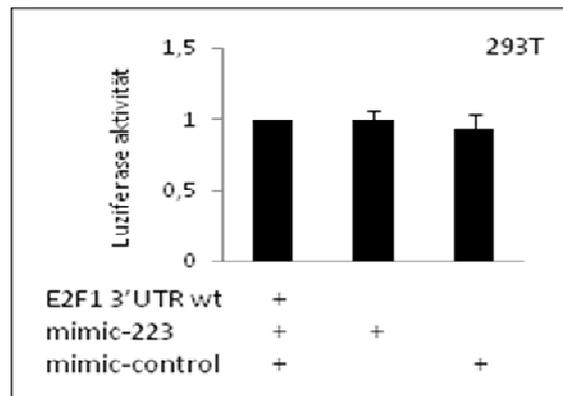
i.



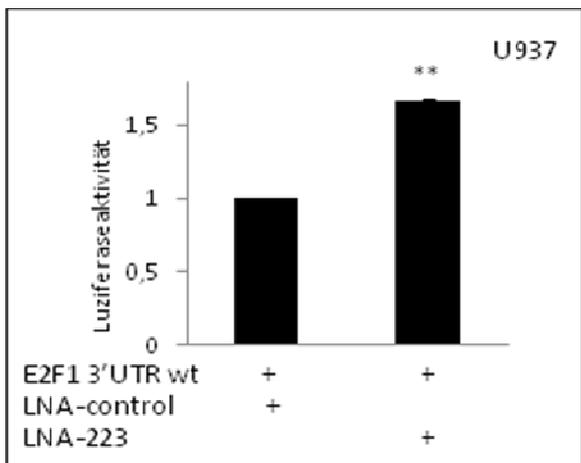
j.



k.



l.

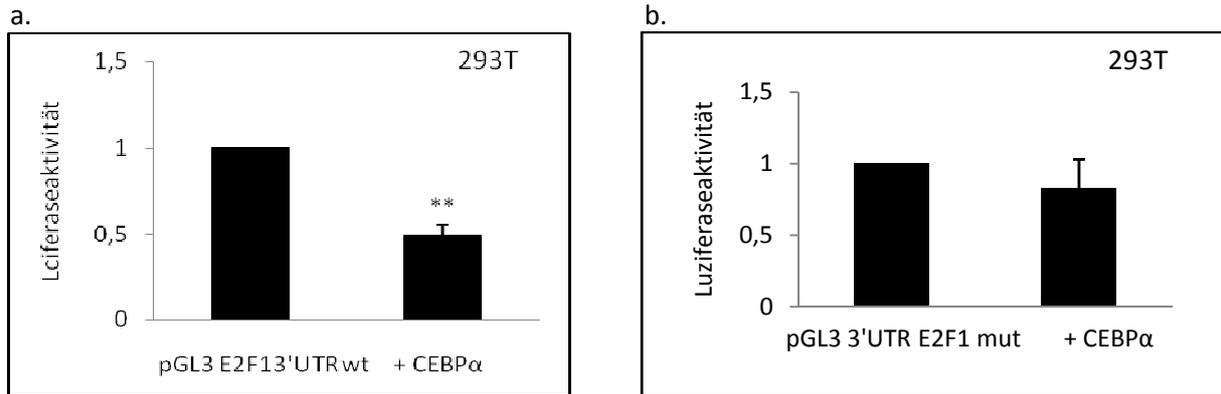


**Abb. 7: E2F1 ist ein neues Zielgen der miRNA-223**

a.-d. Die Zellen wurden für die angegebene Zeit in der Anwesenheit von 5µM β-Estradiol kultiviert.

- a. und c. Im Western Blot Verfahren wurde das Proteinlevel von E2F1 in den beiden Zelllinien K562-C/EBP $\alpha$ -p42ER (a.) und K562-ER (c.), zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6 und 12 Stunden untersucht. Die Immundetektion wurde mit E2F1 spezifischen Antikörpern durchgeführt. Als Ladungskontrolle wurde  $\beta$ -Tubulin verwendet. Die Analyse erfolgte durch densitometrisches Scannen der erhaltenen Banden und anschließender Normalisierung der ermittelten Werte mit  $\beta$ -Tubulin.
- b. und d. Nach RNA-Isolation und RT erfolgte die Analyse des mRNA Expressionslevels mittels qRT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer für E2F1 und für GAPDH als Kontrolle. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. (\*\* p < 0,01)
- e. U937 Zellen wurden mit 2 $\mu$ M mimic-223 bzw. mimic-control mittels AMAXA transfektiert. Nach 24h erfolgte die Analyse des E2F1 Proteinlevels mittels Western Blot Verfahren. Die Immundetektion wurde mit E2F1 spezifischen Antikörpern durchgeführt. Als Ladungskontrolle diente  $\beta$ -Tubulin. Die Analyse erfolgte durch densitometrisches Scannen der erhaltenen Banden und anschließender Normalisierung der ermittelten Werte mit  $\beta$ -Tubulin.
- f. U937 Zellen wurden mit 2 $\mu$ M mimic-223 bzw. mimic-control mittels AMAXA transfektiert. Nach 24h erfolgte die RNA-Isolation. Anschließend erfolgte nach RT die Analyse des E2F1 mRNA Levels mittels qRT-PCR mit spezifischen Primerpaaren für E2F1 sowie GAPDH als Kontrolle.
- g. K562-C/EBP $\alpha$ -p42ER Zellen wurden mit 160nM LNA-223 bzw. LNA-control mittels AMAXA transfektiert und anschließend für 2h mit 5 $\mu$ M  $\beta$ -Estradiol kultiviert. Anschließend erfolgte die Analyse des E2F1 Proteinlevels mittels Western Blot Verfahren. Die Immundetektion wurde mit E2F1 spezifischen Antikörpern durchgeführt. Als Ladungskontrolle diente  $\beta$ -Tubulin. Die Analyse erfolgte durch densitometrisches Scannen der erhaltenen Banden und anschließender Normalisierung der ermittelten Werte mit  $\beta$ -Tubulin.
- h. Schematische Darstellung der potentiellen Bindungssequenz und der verschiedenen Luziferase-Konstrukte. Die 3'UTR von E2F1, hier als schwarze Box, liegt hinter der für das Luziferase-Gen codierenden Region. Die abgebildeten Sequenzen zeigen die potentielle Bindungsregion im 3'UTR wt (pGL3-E2F1-3'UTR wt) und die paarende 'seed'-Sequenz der miRNA-223, sowie das mutierte Konstrukt mit Austausch von 3 Basenpaaren (pGL3-E2F1-3'UTR mut). Die potentielle Sequenz der Interaktion ist grau unterlegt abgebildet, die drei eingeführten Punktmutationen sind hervorgehoben.
- i. Schematische Darstellung der hochkonservierten genomischen Region in der 3'UTR des E2F1 Gens in verschiedenen Spezies. Die potentielle Sequenz der Bindung der miRNA-223 ist grau unterlegt.
- j. 293T Zellen wurden mittels Lipofectamin mit 0,1 $\mu$ g pGL3-E2F1-3'UTR wt und 2 $\mu$ M mimic-223 oder 2 $\mu$ M mimic-control, sowie mit jeweils 0,02 $\mu$ g pRL0 transfektiert. Das Histogramm zeigt die Luziferaseaktivität in den unterschiedlich transfektierten Zellen. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. (\*\* p < 0,01)
- k. 293T Zellen wurden mittels Lipofectamin mit 0,1 $\mu$ g pGL3-E2F1-3'UTR mut und 2 $\mu$ M mimic-control oder 2 $\mu$ M mimic-223, sowie mit jeweils 0,02 $\mu$ g pRL0 transfektiert. Das Histogramm zeigt die Luziferaseaktivität in den unterschiedlich transfektierten Zellen. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. (\*\* p < 0,01)
- l. U937 Zellen wurden mittels AMAXA mit 160nM LNA-223 bzw. LNA-control transfektiert und anschließend wurde die Luziferaseaktivität gemessen. Das Histogramm zeigt die Höhe der Luziferaseaktivität in den unterschiedlich transfektierten Zellen. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. (\*\* p < 0,01)

Abb.8



### Abb. 8: Wirkung C/EBP $\alpha$ s auf die E2F1 Translation

a.+b. 293T Zellen wurden mittels Lipofectamin mit 0,1  $\mu$ g pGL3-E2F1-3'UTR wt (a.) bzw. pGL3-E2F1-3'UTR mut (b.) und 0,05 $\mu$ g eines C/EBP $\alpha$ -Vektors, sowie mit jeweils 0,02 $\mu$ g pRL0 transfektiert. Das Histogramm zeigt die Levels der Luziferaseaktivität in den unterschiedlich transfektierten Zellen. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. (\*\* p < 0,01)

### 3.3 Die Bedeutung der miRNA-223 und der E2F1-Inhibition für die Granulopoese

Die miRNA-223 spielt eine wichtige Rolle für die regelrechte Ausreifung granulözytärer Vorläuferzellen<sup>48</sup> und ihre stark myelo- bzw. granulospezifische Funktion konnte sowohl in humanen, als auch in Mauszellen charakterisiert werden<sup>11,24,27</sup>. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit mittels Überexpressions- und ‚Knockdown‘-Experimente bestätigt und durch Untersuchung der biologische Relevanz der Inhibition des neu identifizierten Zielgens E2F1 für die granulözytäre Differenzierung weitergeführt werden.

Für die Überexpression wurde die pre-miRNA-223-Sequenz in einen Expressionsvektor geklont (223-vector), der dann in myeloische Zellen (Kasumi-6) transfektiert wurde. Im Vergleich zu den Kontrollvektor transfektierten Zellen (control-vector) wiesen die den miRNA-223-Vektor überexprimierenden Zellen eine etwa doppelt so starke miRNA-223 Expression auf (Abb.9a). Zum Zeitpunkt des Erreichens des genannten Expressionslevels wurden die Zellen auf Zeichen der Differenzierung hin untersucht. Hierfür wurden die Expression der mRNA des G-CSF- und des M-CSF-Rezeptors (G-CSF-R, M-CSF-R) analysiert. Dabei zeigte sich ein spezifischer Anstieg der G-CSF-R mRNA Expression in Kasumi-6 Zellen, die mit dem miRNA-223-Vektor transfektiert wurden auf etwa das Doppelte der Ausgangsexpression (Abb.9b). Hingegen zeigte sich bei der Analyse der M-CSF-R Expression keine signifikante Veränderung (Abb.9c). Die Ergebnisse wurden durch jeweiligen Vergleich mit Kontrollvektor transfektierten Zellen ermittelt. Ebenso zeigten Experimente, in denen die miRNA-223 Überexpression mittels der Transfektion sequenzidentischer Oligonukleotide (mimic-223) in den myeloischen U937

Zellen erfolgte, dass diese Zellen ebenfalls Zeichen einer granulozytären Differenzierung aufwiesen. Dies konnte durch einen Anstieg der Expression des für die Granulopoese spezifischen Oberflächenmarkers CD15 nachgewiesen werden (Abb.9d). Dieser Anstieg blieb in der Kontrolle bei Transfektion der Zellen mit Oligonukleotiden einer unspezifischen Sequenz (mimic-control) aus. Diese, für die Granulopoese spezifische Bedeutung der miRNA-223 bestätigte sich außerdem durch die zeitgleich unverändert geringe CD14 Expression, deren Anstieg auf eine monozytäre Differenzierung der Zellen hinwies (Abb.9e). Die Effektivität der Transfektion mit mimic-Oligonukleotiden wurde durch Transfektion der Zellen mit einer entsprechenden Menge siGloRed als Indikator überprüft und ergab eine Transfektionsrate von ca. 70% der Zellen (Abb.10a).

Zur weiteren Untersuchung und Fundierung der kritischen Funktion der miRNA-223 in der Granulopoese, wurden Experimente durchgeführt, in denen die miRNA-223 blockiert wurde. Dies erfolgte durch zuvor erwähnte Oligonukleotide, sogenannte LNAs (locked nucleic acid), die durch eine komplementäre Sequenz an ihre microRNA binden und diese in eine inaktive Form überführen<sup>61</sup>. Die Verwendung der LNA gegen die miRNA-223 (LNA-223) ermöglicht so die Untersuchung der Effekte deren spezifischer Inhibition. Kasumi-6 Zellen, die mit der LNA-223 transfektiert wurden, zeigten im Vergleich zu Kontroll-LNA transfektierten Zellen (LNA-control) eine Reduktion der miRNA-223 Expression auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes (Abb.9f). Kasumi-6 Zellen, deren granulozytäre Differenzierung mit RA induziert werden kann, wurden mit LNA-223 bzw. mit Kontroll-LNA transfektiert und gleichzeitig mit RA behandelt, anschließend erfolgte die Analyse der Expression des für die Granulopoese spezifischen Differenzierungsmarkers CD15. Die LNA-223 transfektierten Zellen wiesen dabei eine um ca. 40% geringere Expression des granulozyten-spezifischen CD15 Oberflächenproteins auf, als Zellen, die mit Kontroll-LNA transfektiert worden waren (Abb.9g: RA+LNA-223: 27% CD15-positiv; RA+Kontroll-LNA: 41% CD15-positiv;). Kasumi-6 Zellen, die nur mit RA behandelt wurden waren durchschnittlich zu 43% CD15 positiv. Bei Überprüfung der Transfektionseffektivität mittels Fluoresceinisothiocyanat-markierter-LNA (FITC-LNA) ließ sich eine ca. 80% Transfektionsrate ermitteln (Abb.10b).

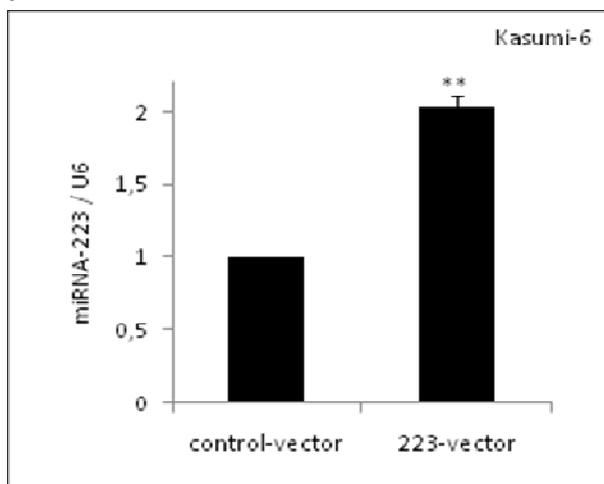
Um die Signifikanz der E2F1 Inhibition, die durch die miRNA-223 gewährleistet werden kann (Abb.7e), für den geregelten Ablauf der Differenzierung in der Granulopoese zu untersuchen, wurden U937 Zellen, die zur E2F1-Überexpression transient mit einem entsprechenden Expressionsvektor transfektiert wurden, mit RA als Differenzierungssignal behandelt. Unbehandelte und mit einem Kontrollvektor transfektierte Zellen dienten als Kontrolle und waren zu 1% positiv für die Expression des granulozyten-spezifischen CD15 Oberflächenmarkers. Die Behandlung mit RA führte zu einem Anstieg des Anteils der CD15 positiven Zellen auf 23%, hingegen waren die Zellen, die statt des Kontrollvektors, den Transkriptionsfaktor E2F1 überexprimierten nach entsprechender RA Behandlung lediglich zu 12% CD15 positiv (Abb.11). Dies belegt den starken differenzierungshemmenden Effekt

von E2F1 und zeigt, wie kritisch sich eine gesteigerte Expression bzw. eine fehlende E2F1 Inhibition auf die granulozytäre Differenzierung auswirken kann.

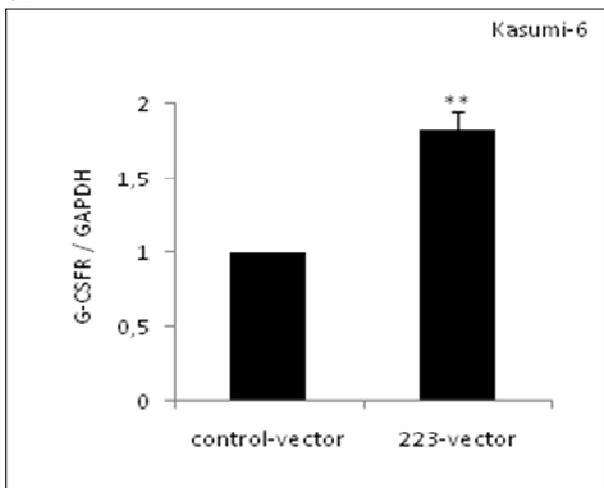
Die genannten Ergebnisse durch Überexpression und Blockierung der miRNA-223 bestätigen eine wichtige und für die granulozytäre Differenzierung spezifische Funktion der miRNA-223. Sie vermag in gewissem Maße eine Differenzierung zu induzieren und ihr Fehlen führt zu einer Störung im normalen Ablauf der Granulopoese, selbst beim Vorhandensein starker Differenzierungssignale, wie hier der Retinolsäure. Desweiteren konnte gezeigt werden, wie bedeutsam das neu identifizierte Zielgen E2F1 und wie relevant dessen Inhibition für die granulozytäre Differenzierung ist.

**Abb.9**

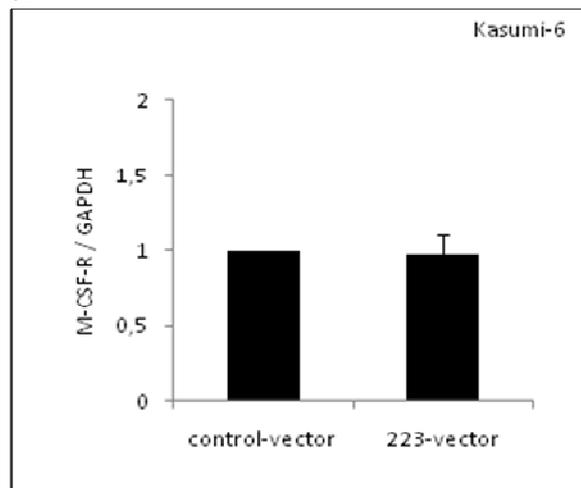
a.

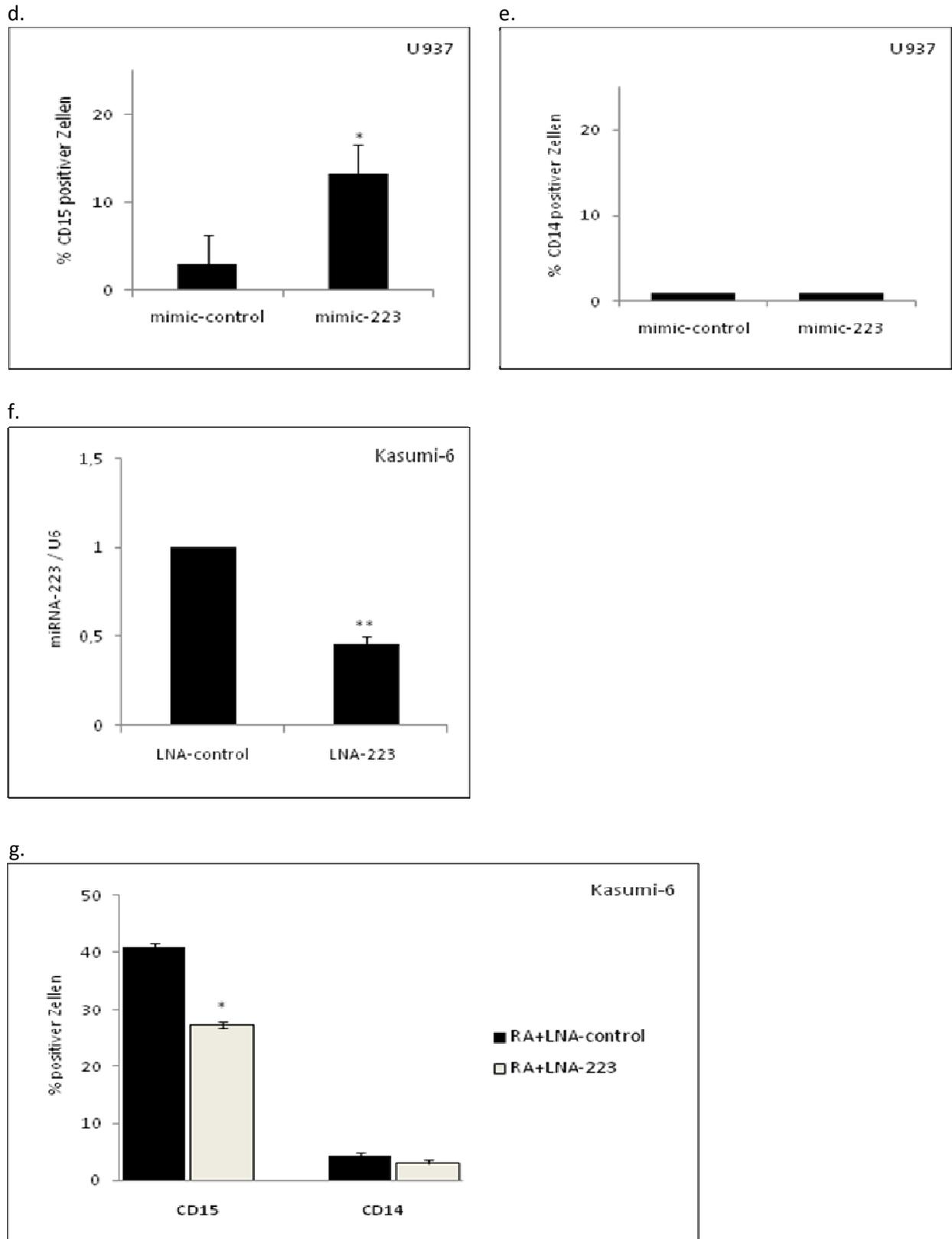


b.



c.





**Abb. 9: Überexpression und Blockierung der miRNA-223**

a. Kasumi-6 Zellen wurden mit dem 223- bzw. mit dem Kontroll-Vektor transfektiert. 48h nach Transfektion erfolgte nach RNA-Isolation und RT die Analyse der miRNA-223 Expression mittels qRT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer für die miRNA-223, sowie für U6 als Kontrolle. Die Balken rep-

räsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung des miRNA-223/U6 Verhältnisses von drei unabhängigen Experimenten. (\*\*  $p < 0,01$ )

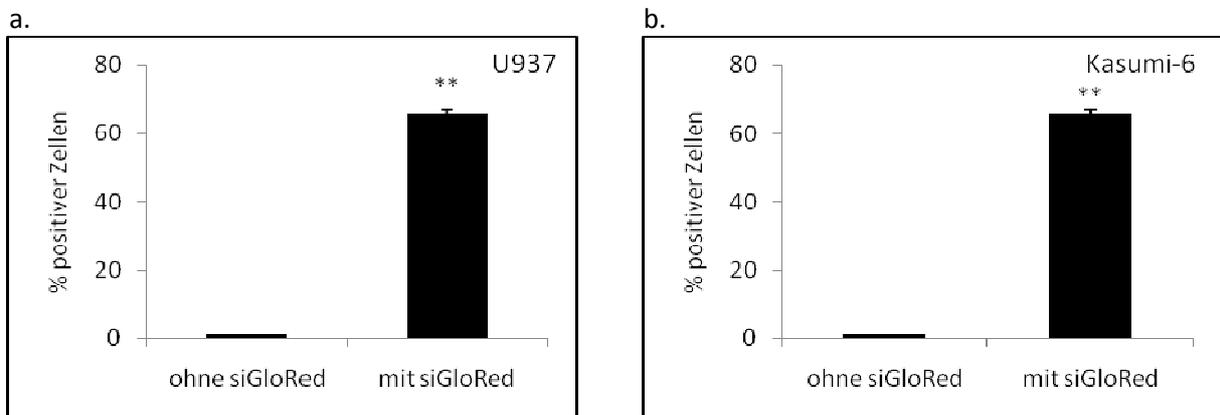
b. und c. Kasumi-6 Zellen wurden mit dem 223- bzw. mit dem Kontroll-Vektor transfektiert. 48h nach Transfektion erfolgte nach RNA-Isolation und RT die Analyse der G-CSF-R- und der M-CSF-R mRNA Expressionslevels mittels qRT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer für G-CSF-R und M-CSF-R sowie für GAPDH als Kontrolle. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung des G-CSF-R/GAPDH bzw. des M-CSF-R/GAPDH Verhältnisses von drei unabhängigen Experimenten. (\*\*  $p < 0,01$ )

d. und e. U937 Zellen wurden mit mimic-223 bzw. mimic-control transfektiert. 48h nach Transfektion erfolgte die Analyse der Differenzierung anhand der Bestimmung des prozentualen Anteils der Zellen, die positiv für eine CD15- bzw. CD14-Oberflächenexpression waren durch FACS-Analyse. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung des prozentualen Anteils der CD15- bzw. CD14-positiven Zellen von drei unabhängigen Experimenten. (\*  $p < 0,05$ )

f. Kasumi-6 Zellen wurden mit dem 160nM LNA-223 oder LNA-control transfektiert. Nach RNA-Isolation und RT erfolgte die Analyse mittels qRT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer für die miRNA-223 und für U6 als Kontrolle. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung des miRNA-223/U6 Verhältnisses drei unabhängiger Experimente. (\*  $p < 0,05$ )

g. Kasumi-6 Zellen wurden mit 160nM LNA-223 bzw. mit 160nM Kontroll-LNA transfektiert und anschließend für 48h mit  $10^{-6}$ M RA behandelt. Die Analyse der Differenzierung erfolgte anhand der Bestimmung des prozentualen Anteils der Zellen, die positiv für eine CD15- bzw. CD14-Oberflächenexpression waren mittels Durchflusszytometrie. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung des prozentualen Anteils der CD15- bzw. CD14-positiven Zellen von drei unabhängigen Experimenten. (\*  $p < 0,05$ )

**Abb.10**



**Abb. 10: Transfektionseffizienz für LNA- und mimic-Oligonukleotide**

a. U937 wurden mit  $4\mu\text{M}$  siGloRed transfektiert.

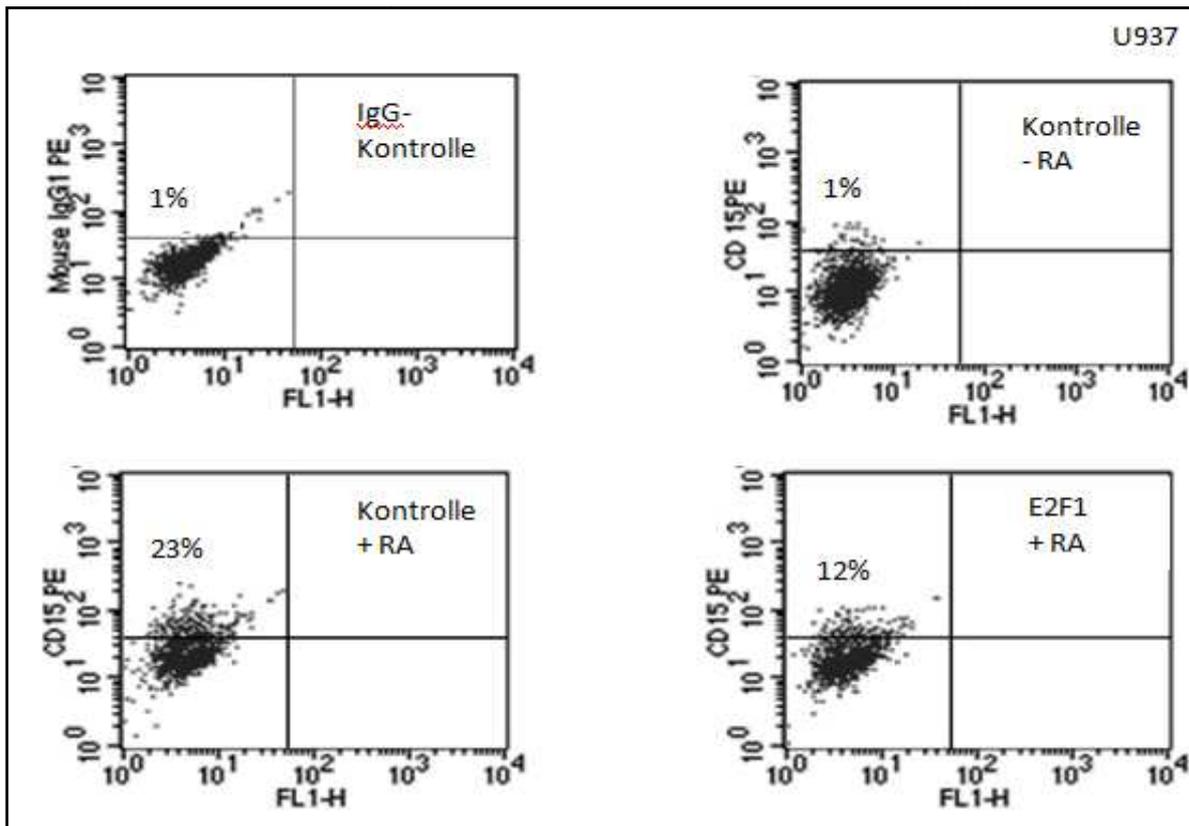
b. Kasumi-6 Zellen wurden mit 160nM FITC-markierter LNA transfektiert.

Der prozentuale Anteil der transfektierten Zellen wurde jeweils durch FACS-Analyse ermittelt.

(\*\*  $p < 0,01$ )

Abb.11

a.



b.

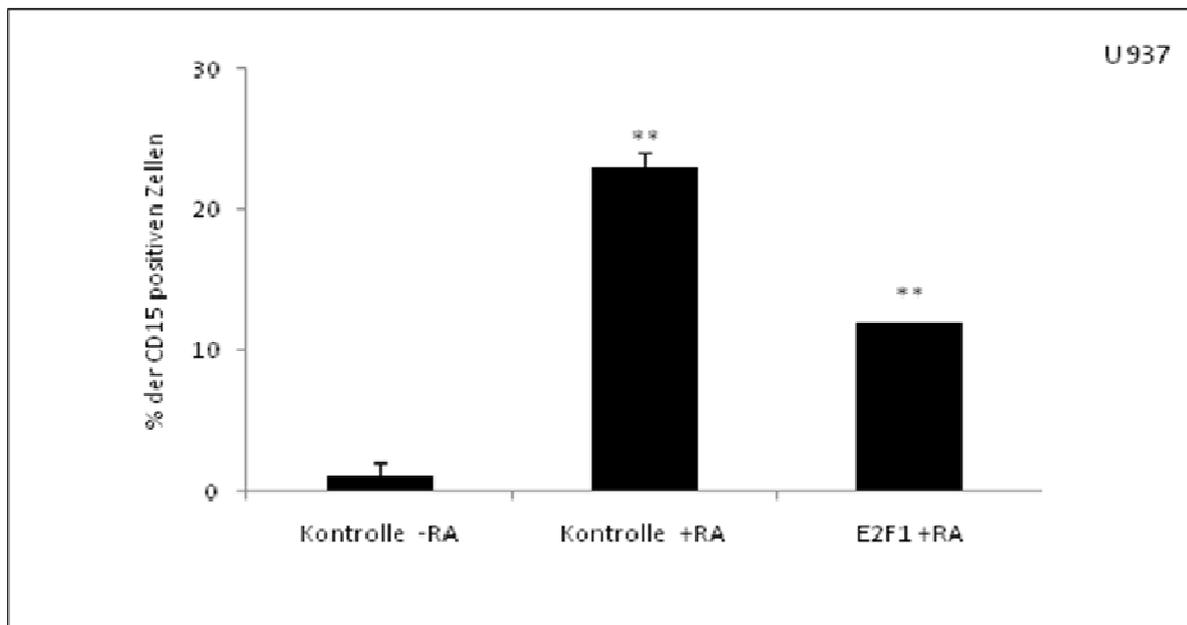


Abb. 11: E2F1 inhibiert die granulozytäre Differenzierung

U937 Zellen wurden zunächst mittels AMAXA mit 2 $\mu$ g eines E2F1-exprimierenden Vektors bzw. eines Kontrollvektors transfektiert, dann erfolgte 12h später die Behandlung dieser Zellen mit 1 $\mu$ M RA. 72h nach der Transfektion bzw. 60h nach der Induktion mit RA erfolgt die Analyse der Oberflächenexpression von CD15 mittels FACS-Analyse.

- a. Exemplarische Darstellung je eines der verschiedenen ‚Dot blot Profile‘ der FACS-Analyse.
- b. Histogramm zur FACS-Analyse. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente. (\*\*  $p < 0,01$ )

### 3.4 Antiproliferative Funktion der miRNA-223

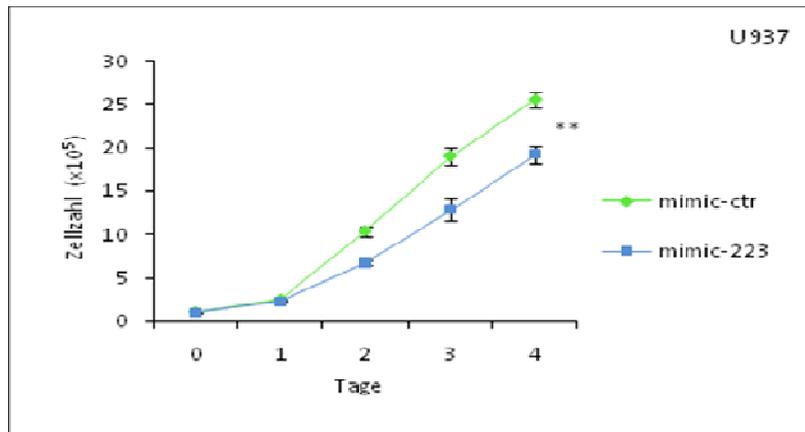
Transgene Mäuse, die eine Mutation des C/EBP $\alpha$ -Gens in einer, für die E2F1 Inhibition wichtigen Region tragen, weisen einen hohen Anteil an myeloischen Vorläuferzellen auf und dabei speziell Zellen der GMP Population<sup>126</sup>. Dies ist Folge der fehlenden antiproliferativen Funktion C/EBP $\alpha$ s. Eine Anreicherung unreifer myeloischer Vorläuferzellen ist eines der typischen Merkmale einer Störung der regelrechten Myelo- bzw. Granulopoese, die auch akut myeloische Leukämien charakterisiert. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte auch bei miRNA-223<sup>-/-</sup> Mäusen eine Anreicherung und Akkumulation unreifer GMPs beobachtet werden<sup>49</sup>. Aufgrund der großen Bedeutung von E2F1 für die Kontrolle der Zellzyklus Progression einerseits und der antiproliferativen Funktion C/EBP $\alpha$ s andererseits, sowie aufgrund des regulatorischen Einflusses von C/EBP $\alpha$  auf die miRNA-223 (Abb.5) und deren inhibitorische Wirkung auf E2F1 während der Granulopoese (Abb.7), wurde eine mögliche antiproliferative Funktion der miRNA-223 während der myeloischen Differenzierung untersucht.

Hierzu wurden U937 Zellen mit mimic-223 bzw. mimic-control Oligonukleotiden transfektiert und anschließend erfolgte die Analyse der Proliferation anhand täglicher Zellzahlbestimmungen. Die Auswertung dieser ergab, dass die Überexpression der miRNA-223 zu einer Reduktion der Proliferation myeloischer U937 Zellen führt. Verglichen mit den Kontroll-Oligonukleotid (mimic-control) transfektierten Zellen zeigte sich eine um ca. 25% reduzierte Zellproliferation bei Anwesenheit der miRNA-223 (Abb.12a).

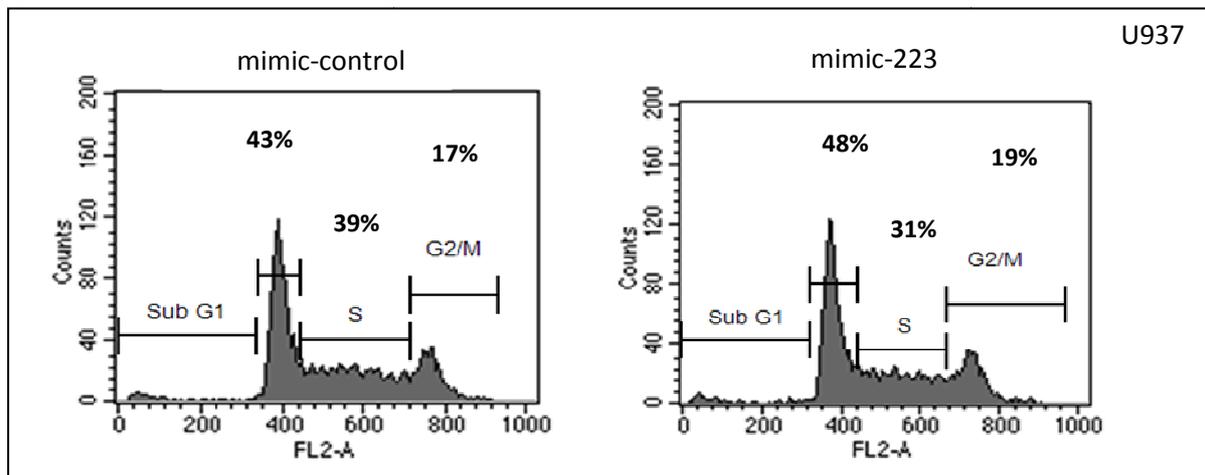
Zur Validierung des beobachteten Effektes erfolgte in diesen U937 Zellen eine Zellzyklusanalyse. Dabei zeigte sich eine signifikante Veränderung der prozentualen Verteilung der Gesamtpopulation auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Verglichen mit der Kontroll-Oligonukleotid Transfektion führte die Anwesenheit der mimic-223 Oligonukleotide zu einer signifikanten Abnahme der Anzahl der in der S-Phase befindlichen Zellen und zur Akkumulation derer in der G0/1 Phase (Abb.12b+c).

Abb.12

a.



b.



c.

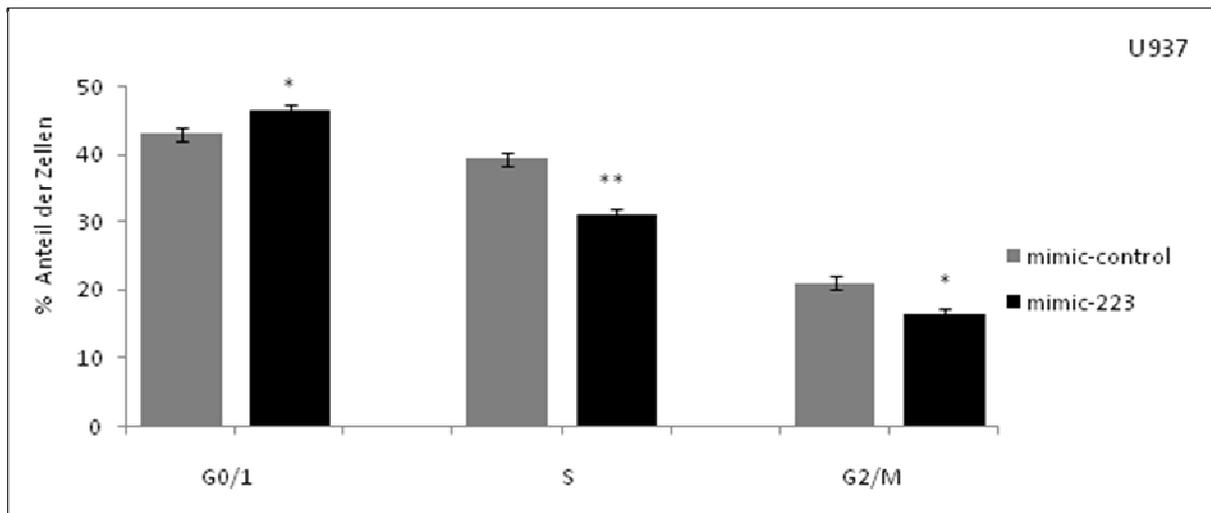


Abb. 12: Antiproliferative Funktion der miRNA-223

a. U937 Zellen wurden mit  $4\mu\text{M}$  mimic-223 bzw. mimic-control mittels Lipofectamine 2000<sup>TM</sup> transfektiert. Anschließend erfolgte 4 Tage lang täglich eine Zellzählung in 3 unabhängigen Transfektionssansätzen.

b. Zellzyklus-Analyse in U937 Zellen, die mit 8µM mimic-223 bzw. mimic-control mittels Lipofectamine 2000™ transfektiert worden waren. Durch FACS-Analyse erfolgte die Ermittlung der prozentualen Verteilung der Zellen in die einzelnen Phasen des Zellzyklus, dabei wurden G1, S und G2/M Phase unterschieden. Exemplarisch dargestelltes Ergebnis der FACS-Analyse jeweils eines der Experimente in mimic-223 und mimic-control transfektierten Zellen.

c. Histogramm zur Zellzyklus-Analyse. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. ( \*\* p < 0,01, \* p < 0,05)

### 3.5 Verschiedene AML Subtypen weisen ein reduziertes miRNA-223 Expressionslevel auf

In der Leukämogenese spielt das Fehlen oder die Dysfunktion wichtiger Differenzierungsvorgänge regulierender Faktoren eine bedeutende Rolle. Solche Regulationsstörungen führen bei der AML zu einem Differenzierungsblock im Stadium früher Vorläuferzellen, wodurch es zu einer Akkumulation unreifer Blasten im Knochenmark kommt. Einer der Transkriptionsfaktoren, dessen Dysfunktion in leukämischen Blasten einiger AML Subtypen beobachtet wurde, ist C/EBPα. Seine Tumorsuppressoraktivität wird durch verschiedene Translokationen, die in AML Subtypen zu finden sind, supprimiert<sup>31,79,82,88</sup> oder aber das Protein selbst liegt in mutierter, nicht normal funktionsfähiger Form vor<sup>80,100,117</sup>.

Auch microRNAs, als weitere regulierende Faktoren, greifen nicht nur in physiologische Prozesse ein, sondern spielen auch bei der malignen Transformation und der Pathogenese verschiedener Tumorentitäten eine Rolle. In verschiedenen Arbeiten konnten bereits Korrelationen zwischen veränderten miRNA-Expressionsmustern und bestimmten Tumorentitäten dokumentiert werden<sup>11,66</sup>. Dabei wurde häufiger eine Reduktion der Expression bestimmter miRNAs in den maligne transformierten Zellen, verglichen mit dem jeweils entsprechenden gesunden Gewebe, beobachtet. Diese verminderte Expression einzelner miRNAs lässt die Annahme zu, dass es sich bei diesen miRNAs um tumorsupprimierende Faktoren handelt. Ein Fehlen dieser kann somit einen fördernden Einfluss auf maligne Transformationen haben.

Sowohl vorausgegangene, als auch Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit belegen die durch C/EBPα vermittelte Induktion der miRNA-223 Expression während der granulozytären Differenzierung und die besondere Bedeutung der miRNA-223 für die Granulopoese<sup>24</sup> (Abb.5,9).

Da also die Transkription der miRNA-223 durch C/EBPα reguliert wird und für die Reifung der Granulozyten wichtig ist, und da C/EBPα in einigen AML Subtypen entweder inhibiert, vermindert exprimiert oder mutiert vorliegt, stellt sich die Frage, ob sich diese gestörte Funktion von C/EBPα auch mit einer verminderten miRNA-223 Expression einhergeht. Bisher bekannt ist, dass eine verminderte miRNA-223 Expression oder ihre vollständige Abwesenheit zu Störungen in der Granulopoese und zur Anreicherung von Vorläuferzellen führt<sup>24,49</sup>.

Es wurden insgesamt 18 Patientenproben hinsichtlich ihrer miRNA-223 Expression untersucht (Tab.12). Die Patientenproben mit normalem Karyotyp, bei denen keine Funktionsstörung C/EBP $\alpha$ s bekannt war, dienten als Kontroll- bzw. Vergleichsgruppe. Das Patientenprobengut setzte sich aus jeweils 3 Proben der folgenden AML Subtypen zusammen: Translokation t(8;21), Translokation t(15;17), Komplexer Karyotyp (ck), Flt3-ITD (FMS-like-tyrosine-kinase3 mit interner Tandemduplikation), AML mit C/EBPA-Mutation (CEBPA mut) und 3 Proben von Patienten mit normalem Karyotyp (nk).

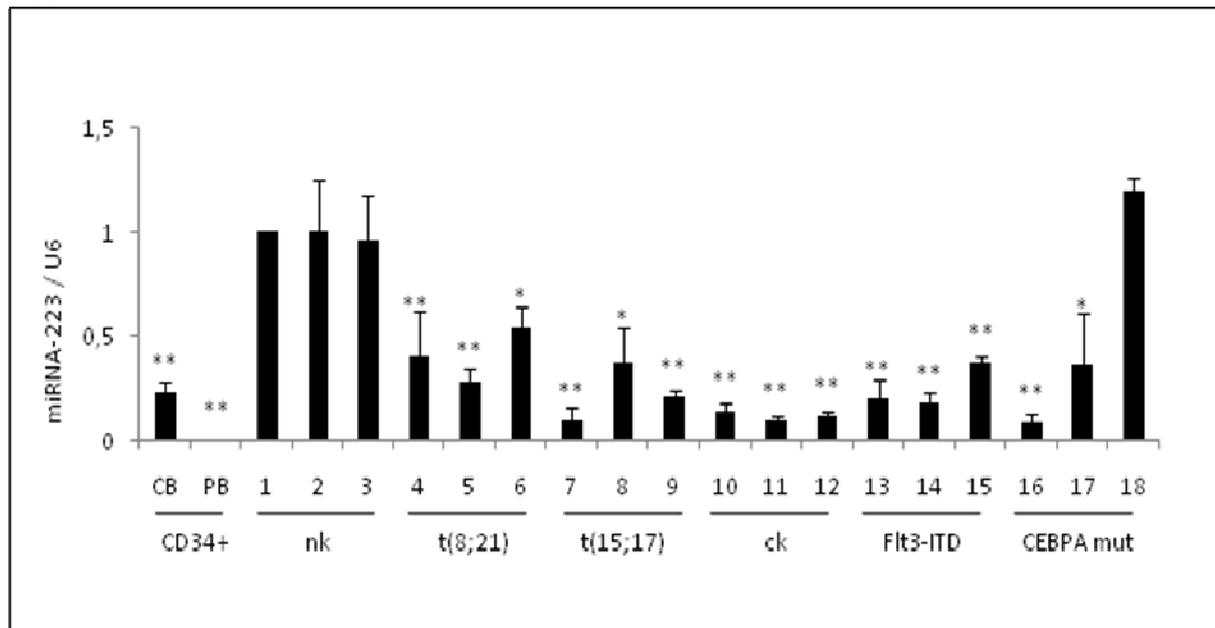
Bei der Analyse des miRNA-223 Expressionslevels bestätigte sich die Annahme, dass in AML Subtypen mit bekannter Störung der Funktion C/EBP $\alpha$ s die Regulation der miRNA-223 beeinflusst und damit seine regelrechte Expression vermindert ist. Im Vergleich zu den Expressionslevels bei AML mit normalem Karyotyp (Abb.13, Nr.1-3) zeigten nahezu alle untersuchten AML Subtypen eine reduzierte Expression der miRNA-223 (13, Nr. 4-17).

Desweiteren wurde die Expression der miRNA-223 in CD34+ Vorläuferzellen untersucht. In diesen undifferenzierten Zellen konnte ebenfalls eine reduzierte Expression der miRNA-223 eruiert werden. Diese Korrelation einer geringeren Expressionen bestimmter miRNAs in AML und in gesunden Vorläuferzellen konnte auch in der Vergangenheit schon für beobachtet werden und deutet auf die vorhandene Unreife dieser Zellen hin<sup>30</sup>.

Zusammengefasst zeigt also eine Gruppe von AML Subtypen, denen eine Funktionsstörung C/EBP $\alpha$ s gemeinsam ist, im Vergleich zu einem AML Subtyp (nk) ohne eine bekannte Beeinträchtigung von C/EBP $\alpha$  ein vermindertes Expressionsniveau der miRNA-223.

**Tab. 12: Charakteristika der AML Patientenproben**

Patientenprobe	FAB	Blasten%	Karyotyp/Translokation	Mutation
1	M4	80	46,XX	
2	M2	60	46,XX	
3	M1	90	46,XX	
4	M2	unbekannt	46,XY t(8;21)	
5	M2	30	46,XY,t(8;21)	
6	M2	60	45,X,-X,t(8;21)	
7	M3	90	46,XY,t(15;17)	
8	M3	94	46,XY,t(15;17)	
9	M3v	95	46,XY, t(15;17)	
10	M2	85	46,XX (komplexer Karyotyp)	
11	M0	70	46,XX (komplexer Karyotyp)	
12	M0/M1	90	46,XY (komplexer Karyotyp)	
13	M4	80	46,XX	FLT3+
14	M2	60	46,XX	FLT3+
15	M1	90	46,XX	FLT3+
16	M2	unbekannt	unbekannt	CEBPA+
17	M2	30	46,XY	CEBPA+
18	M2	60	46,XX	CEBPA+

**Abb.13****Abb. 13: Reduzierte Expression der miRNA-223 in verschiedenen AML Subtypen**

Das miRNA-223-Expressionslevel in den verschiedenen AML Patientenproben sowie in den CD34+ Zellen wurden nach RNA-Isolation und RT in cDNA, mittels qRT-PCR ermittelt und als miRNA-223/U6

Verhältnis dargestellt. Die einzelnen Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die zugehörige Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten einer AML- Patientenprobe bzw. der untersuchten CD34+ Proben (CB, PB). (\*  $p < 0,05$  , \*\*  $p < 0,01$ )

### 3.6 E2F1 reguliert in einem ‚Feedback-Loop‘ die miRNA-223 Transkription

Sowohl die lange bekannten Transkriptionsfaktoren, als auch die erst kürzlich entdeckten miRNAs spielen bei der Regulation der Genexpression eine wichtige Rolle. Dabei ist sowohl anzunehmen, dass beide Gruppen kooperativ agieren, als auch von gegenseitigen Regulationsmechanismen zwischen Transkriptionsfaktoren und miRNAs auszugehen. Eine interessante Art der gegenseitigen Beeinflussung sind Schaltkreise mit einer negativen Rückkopplung, sog. ‚Feedback-Loops‘. Diese konnten bereits für verschiedene miRNAs und ihre Zielgenen beschrieben werden<sup>10,24,52,108,124</sup>.

In verschiedenen Arbeiten wurde inzwischen beobachtet, dass der Transkriptionsfaktor E2F1 die Fähigkeit besitzt miRNAs zu regulieren und, dass dies auch für die Pathogenese verschiedener Tumoren von Bedeutung sein kann<sup>83,108,119</sup>. Basierend auf der Beobachtung einer inversen Korrelation zwischen der Expression der miRNA-223 und der des E2F1 Transkriptionsfaktors (Abb.7e,g) wurde die Existenz einer zwischen diesen beiden Faktoren vorhandenen gegenseitigen Regulation, im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus, angenommen. Hierzu wurde der Frage der Existenz eines regulatorischen Einflusses von E2F1 auf die miRNA-223 Expression nachgegangen. Bei Überexpression von E2F1 in myeloischen U937 Zellen (Abb.14a) und ergab die anschließende Analyse der miRNA-223 Expression in diesen Zellen, dass sich diese umgekehrt proportional zum Expressionslevel von E2F1 verhielt: eine Überexpression von E2F1 ging einher mit einem deutlich verminderten miRNA-223 Level (Abb.14b). Dabei zeigte sich eine Reduktion der miRNA-223 Expression um etwa 60% im Vergleich zu Kontroll-Vektor transfektierten Zellen (control-vector) (Abb.14b)

Um zu beantworten, ob es sich hierbei um eine direkte negative Regulation der miRNA-223 Transkription durch E2F1 handeln könnte, wurde zunächst der von Fukao et al. identifizierte ‚core‘ Promotor der miRNA-223 (Ppri-miRNA-223-Promotor<sup>27</sup>) auf mögliche Bindungsmotive für E2F1 mit Hilfe der Transfac Software untersucht. Bei der Sequenzanalyse des genannten Promotors fanden sich tatsächlich 2 potentielle Bindungsstellen für E2F1. Eine dieser lag interessanterweise in der von Fukao et al. identifizierten hochkonservierten Region des Ppri-miRNA-223-Promotors, der sogenannten ‚conserved region‘, wenige Basenpaare vor der Transkriptionsstartseite gelegen (Abb.14c). Für den Nachweis eines regulatorischen Einflusses von E2F1 auf diesen ‚core‘ Promotor wurden Luziferase-Assays für den Ppri-miRNA-223-Promotor durchgeführt. Hierfür wurden myeloische U937 Zellen mit den in Abb.14c dargestellten Luziferasekonstrukten: dem Ppri-miRNA-223-Prom-1 (-1205bp bis +23bp des Ppri-miRNA-223-Promotors) und mit dem Ppri-miRNA-223-Prom-2 (-293bp bis +23bp des Ppri-miRNA-223-Promotors) oder zur Kontrolle mit dem leeren pGL3 Vektor, transfektiert. Die Ko-

Transfektion des Ppri-miRNA-223-Prom-1 Konstrukts mit einem E2F1-exprimierenden Vektor führte dabei zu einer Reduktion der Luziferaseaktivität auf ca. 40% des Ausgangswertes (Abb.14d, 2.Balken). Bei Ko-Transfektion des E2F1-Expressionsvektors mit dem Ppri-miRNA-223-Prom-2 Konstrukt, das nur eine der beiden E2F1-Bindungssequenzen enthält, sowie mit dem leeren pGL3 Vektor hingegen, konnte kein signifikanter negativer Effekt beobachtet werden (Abb.14d, 4. und 6. Balken). Desweiteren fanden sich im Ppri-miR-223-Promoter auch zwei CCAAT-Motive, die bekannterweise C/EBP $\alpha$  als Bindungssequenz dienen. Die gleichzeitige Transfektion von C/EBP $\alpha$ -exprimierenden Vektoren führte zwar zu einer Steigerung der Luziferaseaktivität, allerdings schien es sich hierbei um einen unspezifischen Effekt C/EBP $\alpha$ s auf den pGL3 Vektor zu handeln, da dieser Effekt in gleicher Höhe bei Ko-Transfektion mit dem leeren pGL3 Vektor zu beobachten war.

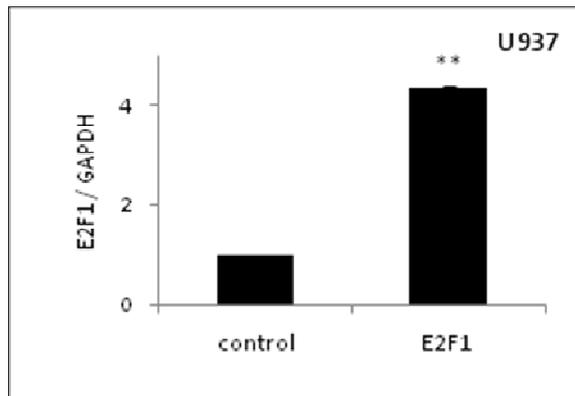
Bei der durch Fazi et al. erstmals beschriebenen regulatorischen Funktion C/EBP $\alpha$ s auf die miRNA-223 Expression war ein anderer, innerhalb des zweiten Introns des miRNA-223 Gens liegender, Promotor für die Transkriptionsaktivierung durch C/EBP $\alpha$  identifiziert worden<sup>24</sup>. Eine Untersuchung der Sequenz dieser Region, zeigte ebenfalls das Vorhandensein zweier, theoretisch eine E2F1 Bindung ermöglichender Sequenzen. Bei Luziferase Assays für diesen, von Fazi et al. beschriebenen Pre-miR-223-Promotor (Abb.15a) konnte allerdings kein regulatorischer Effekt durch die Anwesenheit von E2F1 eruiert werden. Hingegen zeigte C/EBP $\alpha$  den zuvor von Fazi et al. beschriebenen transaktivierenden Effekt, der sich in einer signifikanten Steigerung der Luziferaseaktivität bei Ko-Transfektion dieses Pre-miR-223-Promotors und eines C/EBP $\alpha$ -exprimierenden Vektors widerspiegelte, verglichen mit der Ko-Transfektion des leeren pGL3 Vektors mit C/EBP $\alpha$  (Abb.15b).

Nach dieser neu entdeckten Repressorfunktion von E2F1 stellte sich die Frage nach der für diese Funktion wichtigen Domäne innerhalb des E2F1 Proteins. Hierzu wurden die Experimente mit dem Ppri-miRNA-223-Prom-1, erneut mit unterschiedlichen E2F1-Mutanten durchgeführt. Dabei zeigte die Mutation in der DNA-bindenden Region im E2F1 Gen (E2F1 Eco132) eine nahezu unbeeinträchtigte inhibitorische Funktion verglichen mit dem Wildtyp Protein (E2F1 wt). Hingegen führte die Deletion der C-terminal gelegenen Transaktivierungsdomäne (E2F1<sub>1-284</sub>) zu einem kompletten Verlust der Repressorfunktion von E2F1. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Transaktivierungsdomäne von E2F1 für dessen inhibitorischen Effekt auf die miRNA-223 Expression essentiell ist (Abb.14e).

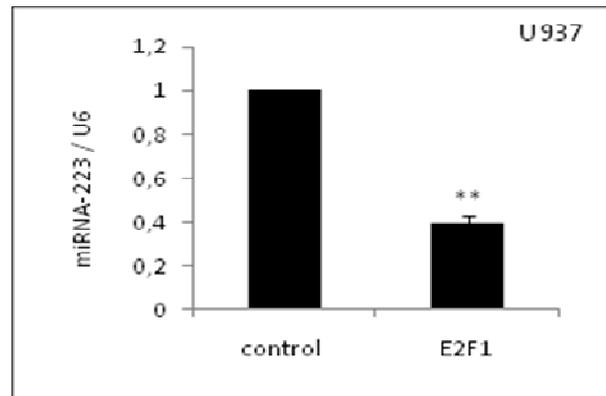
Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse also, dass E2F1 als Repressor auf die miRNA-223 Transkription wirkt. E2F1 agiert als eine Art Gegenspieler des, die miRNA-223 aktivierenden Transkriptionsfaktors C/EBP $\alpha$ . Die Vermittlung dieser Effekte ist aber nicht durch eng zusammenliegende Sequenzen im miRNA-223 Gen, sondern durch unterschiedliche, derzeit in ihrer hierarchischen Bedeutung noch nicht näher bestimmte ‚Promotorsequenzen‘ vermittelt.

Abb.14

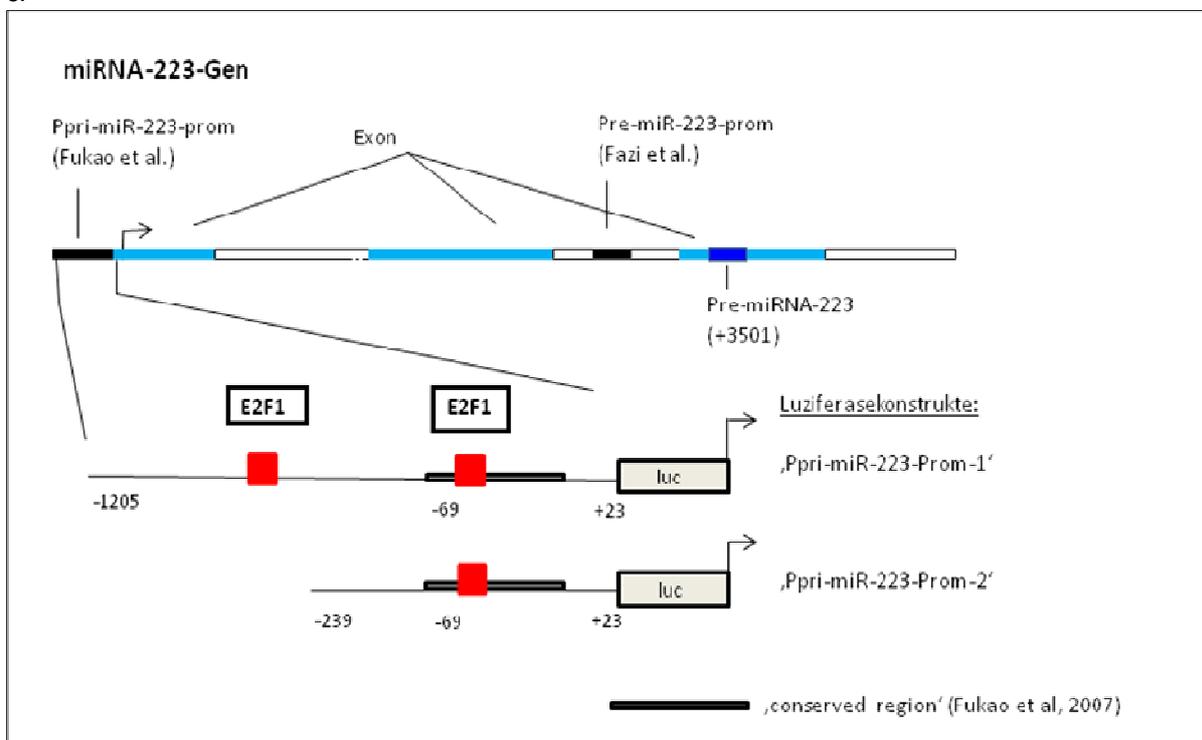
a.



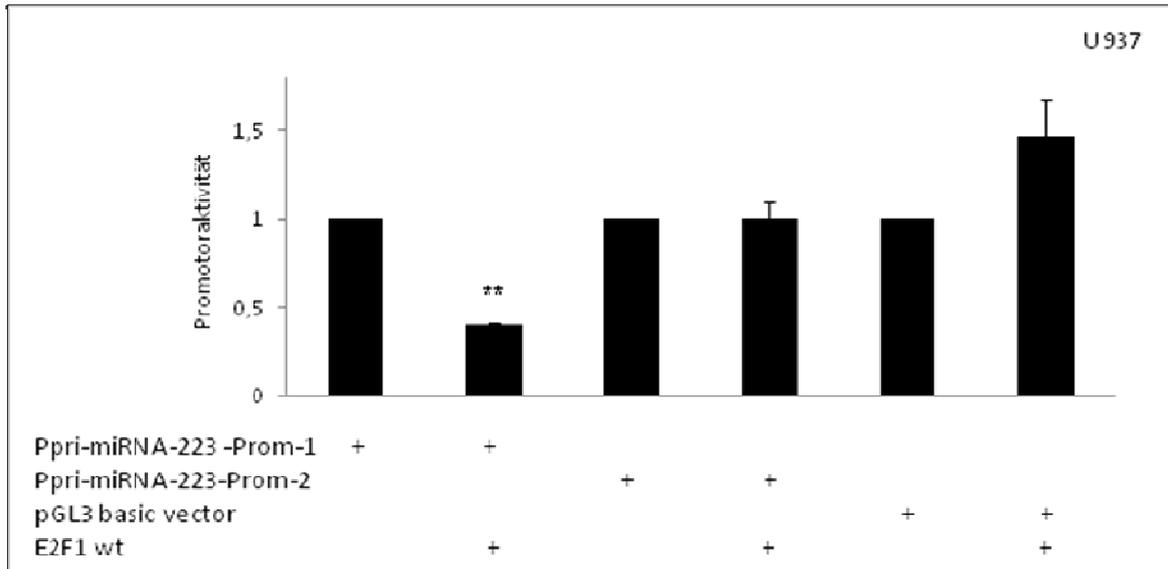
b.



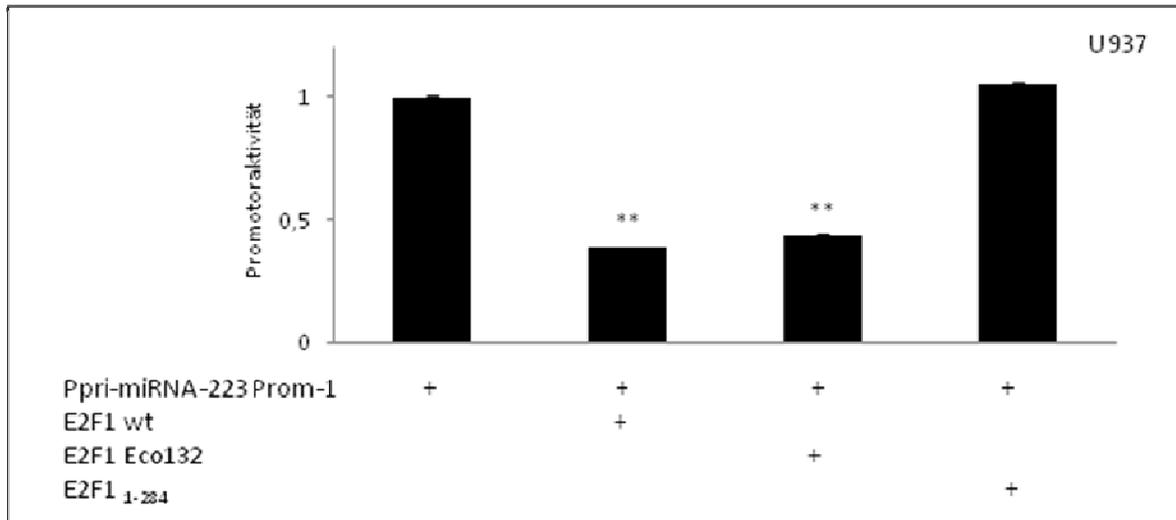
c.



d.



e.



#### Abb. 14: Regulation der miRNA-223 durch E2F1

a. 24h nach der Transfektion eines E2F1 exprimierenden Vektors in U937 Zellen erfolgte nach RNA-Isolation und RT die Analyse der E2F1 Expression mittels qRT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer für die E2F1 und GAPDH als Kontrolle. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. (\*\*  $p < 0,01$ )

b. 24h nach der Transfektion eines E2F1 exprimierenden Vektors in U937 Zellen erfolgte nach RNA-Isolation und RT die Analyse der miRNA-223 Expression mittels qRT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer für die miRNA-223 und für U6 als Kontrolle. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. (\*\*  $p < 0,01$ )

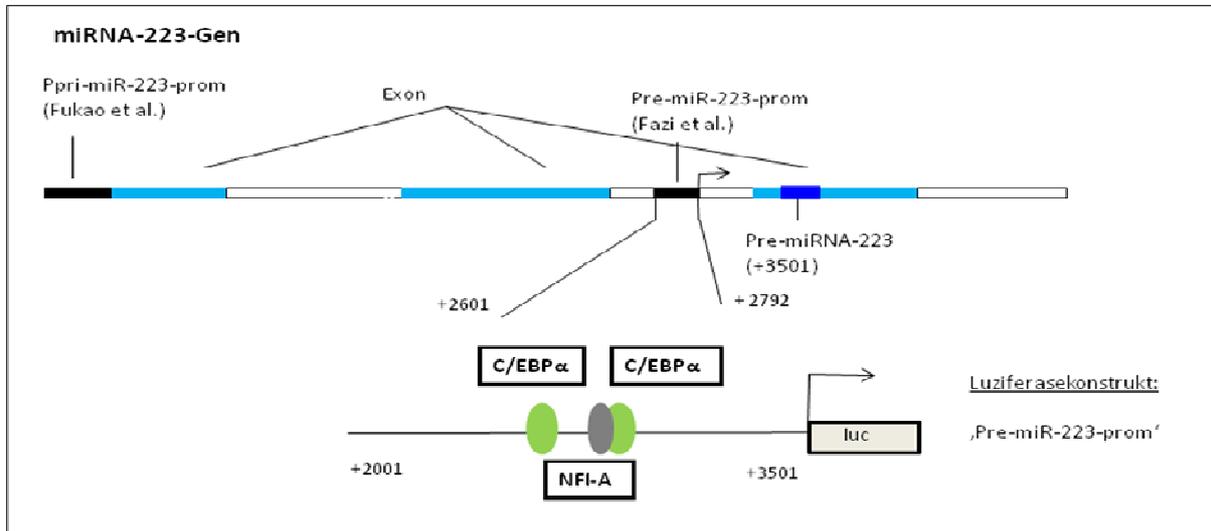
c. Schematische Darstellung des humanen miRNA-223 Gens mit Lokalisation des Ppri-miRNA-223-Promotors mit der ‚conserved region‘, potentiellen Bindungssequenzen für E2F1 sowie verwendeter Ppri-miRNA-223-Promotor-Reporterkonstrukte. Zahlen relativ zur Transkriptionsstartseite als +1.

d.-e. U937 Zellen wurden mit insgesamt 0,7µg des Ppri-miRNA-223-Prom-1, -2 oder pGL3 basic vector, sowie mit 0,2µg eines E2F1 Expressionsvektors (wt, E2F1Eco132, E2F1<sub>1-284</sub>) und 0,1µg pRLO transfiziert. Das Histogramm zeigt die Höhe der Promotoraktivität in den unterschiedlich transfizierten

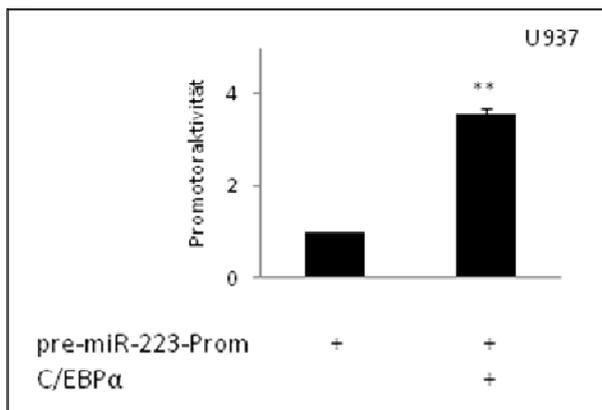
Zellen. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ )

**Abb.15**

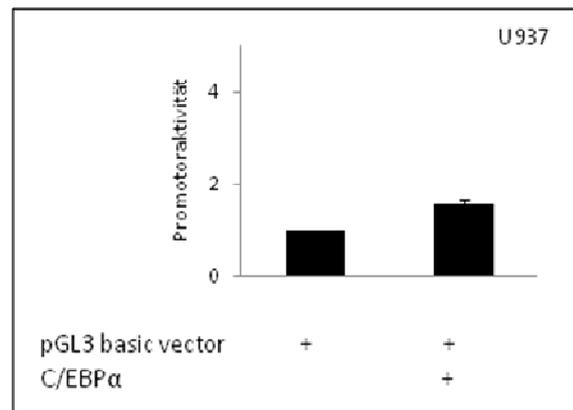
a.



b.



c.



**Abb.15 Regulation der miRNA-223 C/EBPα**

a. Schematische Darstellung des humanen miRNA-223 Gens mit Lokalisation des Pre-miRNA-223-Promotors und den von Fazi et al. identifizierten C/EBPα- und NFI-A-Bindungssequenzen, sowie Darstellung des verwendeten Pre-miRNA-223-Promotor-Konstruktes. Zahlenangaben relativ zur Transkriptionsstartseite als +1.

b.+c. U937 Zellen wurden mit insgesamt 0,7µg des Pre-miRNA-223-Promotors (b.) bzw. des pGL3 basic vectors (c.) und jeweils mit 0,05µg eines C/EBPα Expressionsvektors und 0,1µg pRL0 transfektiert. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. (\*\* $p < 0,01$ )

## 4 Diskussion

### 4.1 Kontext der Arbeit

Die Hämatopoese wird heute als ein dynamischer Prozess verstanden, dessen geregelter Ablauf von der pluripotenten Stammzelle bis hin zu einer ausdifferenzierten Zelle eines bestimmten Zelltyps durch das Zusammenspiel verschiedener Signale in der Zelle gewährleistet wird. Kommt es zu einer Störung innerhalb dieser regulatorischen Mechanismen, so kann dies zu einer Dysbalance zwischen Proliferation und Differenzierung führen. Folge einer solchen kann die fehlende Ausreifung und die gleichzeitig starke Vermehrung entsprechender undifferenzierter Vorläuferzellen sein.

Auch microRNAs sind in diese regulatorischen Netzwerke involviert. Das Zusammenwirken und die Interaktion dieser neu entdeckten kleinen Moleküle mit den klassischen Transkriptionsfaktoren konnte in verschiedenen Arbeiten bereits belegt werden<sup>10,24,52,107,108,124</sup>. Das Hauptaugenmerk bei der Erforschung der Relevanz der miRNAs für physiologische und pathologische Abläufe liegt auf der Identifizierung neuer durch sie regulierter Gene. Innerhalb der großen Zahl möglicher Zielgene konnten allerdings bisher nur wenige verifiziert werden. Es ist daher von großer Bedeutung, diejenigen Zielgene einer miRNA zu identifizieren, die tatsächlich von biologischer Bedeutung sind. Dabei liegt der Fokus nicht nur auf der Erlangung neuer Erkenntnisse zur physiologischen Funktion einzelner miRNAs, sondern es besteht auch Interesse, die Rolle einzelner miRNAs in pathologischen Prozesse genauer zu verstehen.

Das Expressionsmuster von miRNAs ist von Gewebe zu Gewebe, von Zelltyp zu Zelltyp, sehr unterschiedlich. So konnten auch für das hämatopoetische System miRNAs identifiziert werden, deren Expression spezifisch für die verschiedenen Zelltypen des Blutes ist. Der derzeitige Wissensumfang über Involvierungen verschiedener miRNAs in die Entstehung hämatologischer Malignitäten ist bisher noch gering.

Die Expression der miRNA-223 ist spezifisch für myeloische Zellen des hämatopoetischen Systems, sie spielt speziell eine Rolle in der granulozytären Differenzierung myeloischer Vorläuferzellen und wird präzise durch myeloische Transkriptionsfaktoren reguliert<sup>24,27,49</sup>. C/EBP $\alpha$ , ein für die Granulopoese essentieller Transkriptionsfaktor, wurde durch Fazi et al. als einer dieser Regulatoren der miRNA-223 identifiziert<sup>24</sup>. Die Regulation der miRNA-223 durch C/EBP $\alpha$  war hier zuerst durch Retinolsäure Induktion von NB4 Zellen, einer APL-Zelllinie, nachgewiesen worden. Die Retinolsäure induziert neben C/EBP $\alpha$  auch die Expression verschiedener anderer Faktoren, daher könnten theoretisch auch weitere Faktoren dem beobachteten Anstieg der miRNA-223 Expression zugrundeliegen. Um die spezifisch durch C/EBP $\alpha$  vermittelte Transaktivierung der miRNA-223 ermitteln zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit das Modell einer C/EBP $\alpha$  induzierbaren Zelllinie verwendet. Die gezielte C/EBP $\alpha$  Induktion zeigte dabei einen pulsartigen Anstieg der miRNA-223 Expression und baldigen erneuten

Rückgang zum Ausgangslevel (Abb.5a). Dies lässt annehmen, dass die miRNA-223 besonders zu Beginn der granulozytären Differenzierung eine kritische Rolle spielt.

C/EBP $\alpha$ <sup>-/-</sup>-Mäuse weisen eine Differenzierungsstörung auf, die sich auf die neutrophilen Granulozyten beschränkt. Eine fehlende C/EBP $\alpha$  Expression führt speziell zur Blockierung der Weiterentwicklung von CMPs zu GMPs. Gleichzeitig reicht die alleinige Expression C/EBP $\alpha$ s aus, um in bipotenten Vorläuferzellen eine granulozytäre Differenzierung zu induzieren. Experimente mit miRNA-223<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigen ebenfalls eine Störung der Granulopoese und eine Akkumulation von GMPs<sup>49</sup>.

Diese bisherigen Erkenntnisse weisen ebenfalls darauf hin, dass der miRNA-223, genau wie C/EBP $\alpha$ <sup>117,118</sup>, eine besondere Bedeutung in der frühen Granulopoese zukommt. Da ein Fehlen der miRNA-223 teils ähnliche Charakteristika einer fehlenden oder reduzierten C/EBP $\alpha$  Expression aufweist ist außerdem anzunehmen, dass einige Funktionen des oft als ‚Masterregulator‘ bezeichneten Transkriptionsfaktors C/EBP $\alpha$  in enger Verbindung mit dem Vorhandensein der miRNA-223 stehen oder für deren Vermittlung die Expression der miRNA-223 essentiell ist. Weitere Aufschlüsse hierzu könnten zukünftige Analysen vergleichender Untersuchungen entsprechender Knockout Mäuse geben.

Das bereits identifizierte Zielgen NFI-A ist nur eines, möglicher hunderter von Genen, die durch die miRNA-223 reguliert sein könnten. Da miRNAs negativ regulatorische Effekte ausüben zählen im Falle der miRNA-223 zu möglichen Zielgenen vor allem solche, deren Suppression während der Zelldifferenzierung wichtig ist und gewährleistet sein muss um den regelten Ablauf der Granulopoese zu ermöglichen. Hierbei bestand, auf dem Hintergrund der Regulation der miRNA-223 durch C/EBP $\alpha$ , spezielles Interesse an der Untersuchung der Rolle der miRNA-223 in der Vermittlung inhibitorischer Funktionen von C/EBP $\alpha$ , vor allem seiner Hemmung proliferationsfördernder Faktoren. Eine der kritischsten Komponenten dieser antiproliferativen Funktion C/EBP $\alpha$ s ist die Inhibition des Transkriptionsfaktors E2F1. E2F1 ist ein bekannter proliferationsfördernder Transkriptionsfaktor, der als eine Art Gegenspieler C/EBP $\alpha$ s die Progression des Zellzyklus fördert. Während der Granulopoese ist die Inhibition von E2F1 für den regelrechten Ablauf der Zelldifferenzierung von essentieller Bedeutung<sup>87</sup>. Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse über die durch C/EBP $\alpha$  induzierbare miRNA-223 Expression während der Differenzierung und wegen der noch nicht vollständigen Klärung der Mechanismen der C/EBP $\alpha$ -vermittelten E2F1 Inhibition, wurde der Frage nachgegangen, ob es sich bei E2F1 um ein mögliches neues Zielgen der miRNA-223 handeln könnte und ob C/EBP $\alpha$  Teile seiner inhibitorischen Funktion über die miRNA-223 vermittelt.

#### 4.2 E2F1- ein neues miRNA-223 Zielgen

Nachdem in dieser Arbeit die direkte Regulation der miRNA-223 durch C/EBP $\alpha$  mittels einer C/EBP $\alpha$  induzierbaren Zelllinie nachgewiesen werden konnte, lag der Fokus in der Identifizierung eines neuen, biologisch relevanten Zielgens der miRNA-223.

Der proliferationsfördernde Transkriptionsfaktor E2F1, der durch C/EBP $\alpha$  inhibiert wird, konnte dabei als neues funktionelles Zielgen der miRNA-223 nachgewiesen werden. Sowohl bei indirekter Aktivierung der miRNA-223 mittels der genannten induzierbaren Zelllinie, als auch bei direkter transients Überexpression der miRNA-223 in myeloischen Zellen, konnte eine Reduktion des E2F1 Proteinlevels bei gleichzeitig unbeeinträchtigt mRNA Expression, nachgewiesen werden - typische Charakteristika einer durch miRNAs regulierten Genexpression (Abb.7a,b). Die Korrelation der Ergebnisse der indirekten, durch C/EBP $\alpha$  induzierten, und der direkten miRNA-223 Überexpression in verschiedenen myeloischen Zellen, zeigt, dass es sich bei den Beobachtungen nicht um einen zelllinienspezifischen Effekt handelt, und schließt darüberhinaus aus, dass die negative Regulation von E2F1 ausschließlich durch eine andere C/EBP $\alpha$  regulierte miRNA vermittelt wird. Hingegen ist eine Beteiligung weiterer, bisher nicht identifizierter miRNAs aber theoretisch möglich. Dass die miRNA-223 bei ihrer E2F1 Inhibition tatsächlich Anteile C/EBP $\alpha$  vermittelter Funktionen übernimmt, konnte in Experimenten zeitgleicher Aktivierung von C/EBP $\alpha$  und Blockierung der miRNA-223 nachgewiesen werden: die E2F1 Reduktion auf Proteinebene konnte trotz Anwesenheit C/EBP $\alpha$ s bei Blockierung der miRNA-223 nicht mehr beobachtet werden (Abb.7g). C/EBP $\alpha$  ist ein starker Induktor der granulozytären Differenzierung und stellt während der Differenzierung die E2F1 Inhibition sicher. Die Beobachtung, dass ein Fehlen der miRNA-223 Expression diesen starken C/EBP $\alpha$  vermittelten Effekt zu reduzieren vermag, obgleich es sich bei der miRNA-223 Blockierung, im Gegensatz zur induzierbaren C/EBP $\alpha$  Expression, nur um einen transienten Effekt handelte, zeigt deutlich, dass die miRNA-223 in der E2F1 Inhibition und somit für den Ablauf einer geregelten Granulopoese eine wichtige Rolle spielt.

Die regulatorische Wirkung einer miRNA spielt sich typischerweise auf translationaler Ebene ab und wird über eine Sequenz in der 3'UTR des Zielgens vermittelt. Das klassische Experiment zur Verifizierung dieses Mechanismus erfolgt daher in Form eines Luziferase Assays für die spezifische Region im 3'UTR. Die Spezifität der gefundenen potentiellen Bindungssequenz konnte durch die Einführung von Punktmutationen in dieser und folgendem Ausbleiben des inhibitorischen Effektes im Luziferase Assay belegt werden. Darüberhinaus konnte die, über diese spezifische Sequenz in der 3'UTR von E2F1 vermittelte Inhibition auch als ein durch C/EBP $\alpha$  vermittelbarer Effekt nachgewiesen werden. Die beobachtete noch stärkere Reduktion der Luziferase Aktivität bei Anwesenheit C/EBP $\alpha$ s lässt die Annahme der Existenz weiterer miRNAs, die durch C/EBP $\alpha$  induziert werden und ebenfalls E2F1 inhibieren, zu. Allerdings kommt der miRNA-223 auch in einem solchen Fall eine sehr starke Bedeutung zu, da bei vorhandenen Punktmutationen in seiner spezifischen Bindungssequenz, auch die Anwe-

senheit C/EBP $\alpha$ s kaum noch eine Reduktion der Luziferaseaktivität bewirkte. Somit scheint ein großer Teil des beobachteten inhibitorischen Effekts C/EBP $\alpha$ s auch über eben diese Sequenz, die eine spezifische Erkennungssequenz der miRNA-223 darstellt, vermittelt zu werden. Zur Analyse der Bedeutung des Anteils der miRNA-223 vermittelten E2F1 Inhibition an der Gesamtheit des bekannten hemmenden Effektes C/EBP $\alpha$ s auf E2F1 könnten weitere Experimente in transgenen Mäuse, die keine endogene miRNA-223 Expression aufweisen, dienen.

### 4.3 E2F1- ein Repressor der miRNA-223

Die Aufrechterhaltung der Balance zwischen Proliferation und Differenzierung ist Grundlage für die Entwicklung und den Erhalt einer funktionsfähigen Zelle und wird daher eng kontrolliert und reguliert. Diese akkurate Regulation wird auch durch Schaltkreise zwischen proliferations- und differenzierungsfördernden Faktoren ermöglicht. Während in der Differenzierung eine Hemmung der E2F1 Aktivität durch C/EBP $\alpha$  gewährleistet wird, kann E2F1 in proliferierenden Zellen durch Aktivierung von c-Myc zu einer Inhibition C/EBP $\alpha$ s führen<sup>67</sup>. Aufgrund dieser Hemmung antiproliferativer Faktoren durch proliferationsfördernde Proteine während der Zellvermehrung und aufgrund der Tatsache, dass für E2F1 bereits regulatorische Schaltkreise mit miRNAs beschrieben worden sind<sup>108</sup>, wurde der Frage nach der Existenz eines negativen ‚Feedback-Loops‘ zwischen E2F1 und der miRNA-223 nachgegangen. Einen ersten Hinweis lieferte die Beobachtung einer deutlichen Reduktion der miRNA-223 Expression infolge der Überexpression von E2F1.

Für die Regulation der miRNA-223 Expression wurden inzwischen verschiedene Faktoren ermittelt und untersucht, darunter C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  sowie PU.1. Für die Vermittlung dieser regulativen Einflüsse wurden unterschiedliche Sequenzen im miRNA-223-Gen identifiziert.

Bei der Untersuchung des Ppri-miRNA-223-Promotors konnten zwei spezifische Bindungsmotive für E2F1 gefunden werden (siehe Schema Abb.14c). Dieser Ppri-miRNA-223-Promotor wurde von Fukao et al. als sogenannter ‚core‘ Promotor identifiziert<sup>27</sup>. Er liegt vor dem ersten Exon der Ppri-miRNA-223 und enthält eine über verschiedene Spezies konservierte Region über die PU.1 und C/EBP $\beta$  durch direkte Bindung eine Transaktivierung der miRNA-223 vermitteln<sup>27</sup>. In dieser ‚conserved region‘ liegt interessanter Weise auch eine der beiden oben genannten potentiellen Bindungssequenzen für E2F1. Die Verifizierung der Repressorfunktion von E2F1 zeigte sich in Promotor Assays für den Ppri-miRNA-223-Promotor, wobei die Untersuchung einer 5‘ Deletionsmutante (Ppri-miRNA-223-Prom-2), die nur die in der ‚conserved region‘ liegende E2F1 Bindungssequenz enthielt, keinen regulatorischen Einfluss auf die Promotoraktivität aufwies (Abb. 14d). Entgegen anfänglicher Erwartungen spielt diese, in der konservierten Region des Ppri-miRNA-223-Promotor liegende potentielle E2F1-Bindungssequenz also keine Rolle für die negative Regulation durch E2F1. Hingegen scheint es sich

bei der weiter von der Transkriptionsstartseite entfernt liegende Sequenz um die für die Repressor-funktion von E2F1 bedeutsame Region zu handeln.

E2F1 ist vor allem als positiv regulatorischer Faktor bekannt, nichtsdestotrotz wurde inzwischen auch für eine Reihe von Genen eine Repressorfunktion von E2F1 beschrieben<sup>13,14,57</sup>. Im Gegensatz zu seiner positiv regulatorischen Funktion, die durch direkte DNA-Bindung vermittelt wird, sind die Mechanismen für die negative Einflussnahme teilweise noch nicht vollständig geklärt. Bisher wurden verschiedene Domänen innerhalb des E2F1 Proteins als essentiell für die inhibitorische Regulation identifiziert. Dabei wurde sowohl der C-terminal liegenden Transaktivierungsdomäne, als auch der DNA-bindenden Region eine Bedeutung für diese Funktion zugeschrieben, und es existieren auch Arbeiten, in denen das Vorhandensein beider Domänen für eine effiziente Inhibition als notwendige Voraussetzung beschrieben wurde. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass im Fall der miRNA-223 Suppression die C-terminal gelegene Transaktivierungsdomäne die kritische Region ist.

Die beobachtete Regulation könnte nun tatsächlich durch eine direkte Interaktion von E2F1 mit der, in dieser Region gefundenen Sequenz im Promotor vermittelt werden oder aber, es könnte sich um eine indirekte Regulation handeln, die durch Involvierung weiterer Faktoren vermittelt wird.

Untersuchungen der in diesem Ppri-miRNA-223-Promotor gefundenen CCAAT Seiten zeigten keinen Effekt und somit scheint dieser Promotor für die C/EBP $\alpha$  induzierte Expressionssteigerung der miRNA-223 nicht von Relevanz zu sein.

Fazi et al. identifizierten eine im zweiten Intron des miRNA-223 Gens liegende, eher als ‚enhancer element‘<sup>27</sup> bezeichnete, Sequenz, die circa 1500 Basenpaare vor der pre-miRNA-223 liegt, als den Pre-miRNA-223-Promotor<sup>24</sup> (s. Schema Abb.15a). Fazi et al. zeigten, dass C/EBP $\alpha$  während der Differenzierung an zwei in diesem Promotor befindliche CCAAT Sequenzen bindet<sup>24</sup>. Dies konnte durch Luziferaseaktivitätssteigerung in entsprechenden Promotor-Assays in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Abb. 15b).

Die Frage welcher dieser Promotoren nun der bedeutsamere ist, konnte bislang nicht geklärt werden. Da aber beide Promotorsequenzen für einen der hier untersuchten Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen, keine aber die Effekte beider vermittelt, scheint die Existenz beider von Bedeutung.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die miRNA-Expression also einer, durch die Transkriptionsfaktoren C/EBP $\alpha$  und E2F1 vermittelten Regulation unterliegt. C/EBP $\alpha$  induziert während der Differenzierung die Expression der miRNA-223 wohingegen E2F1, selbst ein durch die miRNA-223 negativ reguliertes Gen, die Expression der miRNA-223 inhibiert. Dabei sind E2F1 und die miRNA-223 über eine Rückkopplungsschleife, einen sogenannten ‚Feedback-Loop‘, miteinander verbunden: die miRNA-223 inhibiert die Translation von E2F1 und E2F1 hemmt deren Transkription. Somit lässt sich ein regulatorisches Netzwerk zwischen der miRNA-223, E2F1 und C/EBP $\alpha$  erkennen (siehe Modell,

Abb. 16). In diesem spielt die miRNA-223 eine entscheidende Rolle bei der C/EBP $\alpha$ -vermittelten E2F1 Inhibition, einer der wichtigsten anti-mitotische Funktionen C/EBP $\alpha$ s während der Granulopoese.

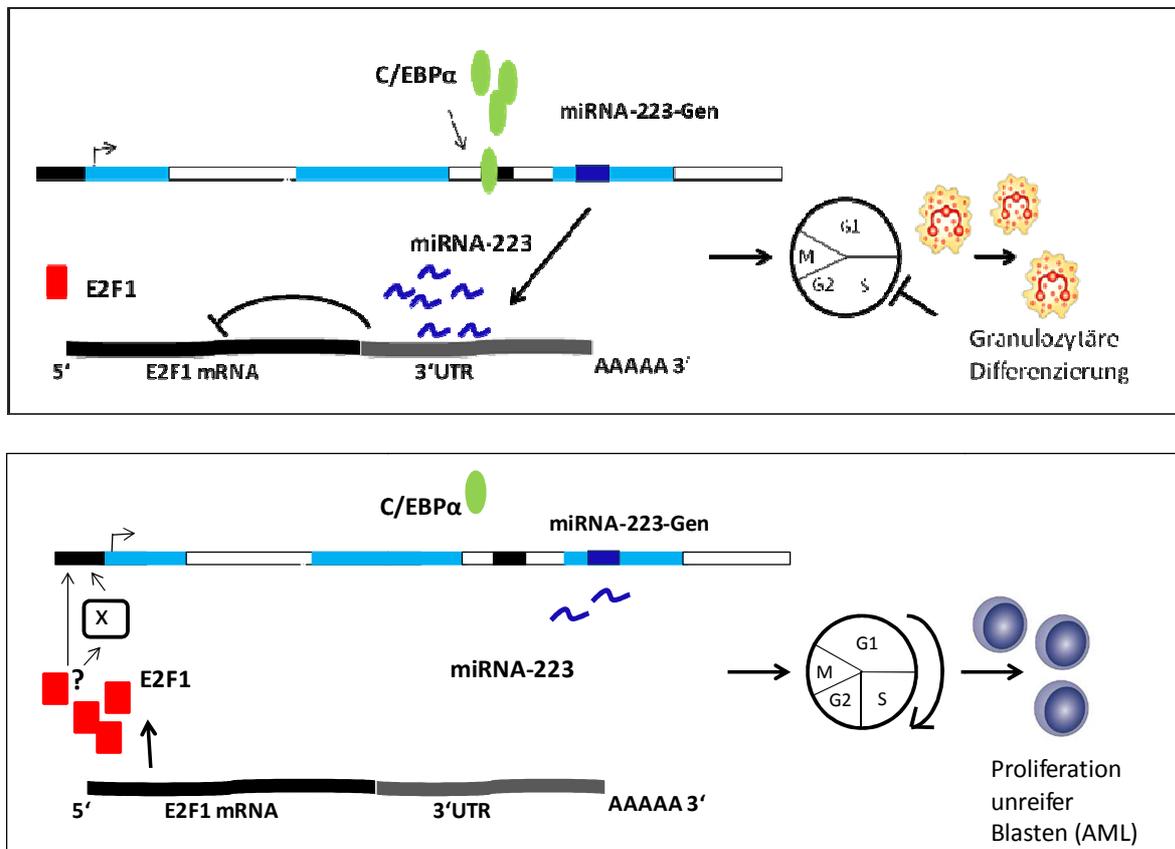


Abb. 16: Modell eines Netzwerkes zwischen C/EBP $\alpha$ , der miRNA-223 und E2F1

#### 4.4 Biologische Relevanz

Die zur längerfristigen Expression der miRNA-223 mit einem miRNA-223 Vektor transfektierten myeloischen Kasumi-6 Zellen zeigten eine Hochregulation des G-CSF-R mRNA Levels bei gleichzeitig unbeeinflusster M-CSF-R mRNA Expression. Die transiente Transfektion mit miRNA-223 sequenzidentischen Oligonukleotiden induzierte eine Steigerung der Expression des granulozyten-spezifischen Oberflächenproteins CD15, ohne einen Anstieg des typischerweise von Monozyten exprimierten CD14-Antigens. Diese beobachteten linienspezifischen Effekte der miRNA-223 zeigten sich vornehmlich in der frühen granulozytären Differenzierung. Eine wichtige Bedeutung für den ‚Anstoß‘ zur granulozytären Differenzierung lassen auch die Ergebnisse aus der C/EBP $\alpha$  induzierbaren Zelllinie vermuten, in der die Induktion zu einem pulsartigen starken Anstieg der miRNA-223 Expression führte. Ganz im Gegensatz zu diesen differenzierungsfördernden Eigenschaften besitzt das hier neu identifizierte miRNA-223 Zielgen E2F1 ein stark differenzierungshemmendes Potential<sup>87,107</sup>. Wie stark dieser inhibitorische Effekt tatsächlich ist, konnte auch in eigenen Experimenten hierzu beobachtet werden: bei der Retinolsäure-Induktion myeloischer U937 Zellen reichte die transiente Überexpression von E2F1 aus, um das starke Differenzierungssignal der Retinolsäure zu überwinden und die Differenzierung dieser Zellen deutlich zu blockieren (Abb.11).

Für den geregelte Zelldifferenzierung ist die zeitgleiche Inhibition der Proliferation von großer Bedeutung. C/EBP $\alpha$  induziert die granulozytäre Differenzierung und hemmt gleichzeitig die Progression des Zellzyklus. Anhand der bisherigen Daten ließ auch die miRNA-223 aufgrund ihrer differenzierungsfördernden Funktion antiproliferative Eigenschaften vermuten. Dies konnte bei der Untersuchung von miRNA-223 transfektierten myeloischen U937 Zellen tatsächlich anhand einer signifikanten Drosselung der Proliferationsgeschwindigkeit beobachtet werden. Die auf diesen Ergebnissen beruhende Annahme eines antiproliferativen Effektes der miRNA-223 bestätigte sich auch in der Zellzyklusanalyse: die Anwesenheit der miRNA-223 führte zu einer Abnahme der Anzahl derjenigen Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befanden, also proliferierten. Da die beobachteten Effekte nur auf einer transienten miRNA-223 Überexpression beruhen, könnten die Effekte, die mit stabiler Überexpression der miRNA-223 erreicht werden, tatsächlich noch weitaus stärker sein. Nach oben genannten Resultaten der verschiedenen Experimente zu Effekten der miRNA-223 auf die Proliferation zeigt sich also, dass diese neben ihrer differenzierungsfördernden Eigenschaft auch eine antiproliferative Funktion besitzt.

Weitere Untersuchungen zur Potenz des hemmenden Effektes der miRNA-223 werden notwendig sein um das Ausmaß dieses antiproliferativen Effektes besser beurteilen zu können. Dabei wird es auch interessant sein, die Auswirkungen einer miRNA-223 Überexpression auf weitere, dem Transkriptionsfaktor E2F1 nachgeschaltete proliferationsfördernde Faktoren zu untersuchen. So ist vorstellbar, dass die miRNA-223 durch diese indirekte Regulation über weitreichende inhibitorische

Effekte in proliferationsfördernden regulatorischen Netzwerken verfügt. Darüberhinaus ist es möglich, dass neben der Inhibition des E2F1 Proteins, Regulationen weiterer, derzeit noch nicht identifizierter direkter miRNA-223 Zielgene bei der antiproliferativen Funktion der miRNA-223 eine Rolle spielen.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit eine, die Zellvermehrung hemmende Funktion als neue Eigenschaft der miRNA-223 entdeckt und charakterisiert werden. Dieser antiproliferative Effekt steht dabei in engem Zusammenhang mit dem neu identifizierten Zielgen E2F1, dessen Suppression während der Differenzierung essentiell ist.

Eine Möglichkeit der umfassenden Aufdeckung weiterer biologisch relevanter Funktionen und Auswirkungen der miRNA-223 bietet seine gezielte Ausschaltung in einem Organismus. Solch ein Modell stellen die zuvor schon erwähnten sogenannten ‚Knockout-Mäuse‘ dar. Die Erfahrung mit Knockout-Mäusen für einzelne miRNAs sind allerdings derzeit noch sehr gering und es existieren bisher nur einige wenige Arbeiten, in denen solche Mäuse untersucht und charakterisiert werden konnten. Das Ausschalten des miRNA-223 Gens im Mausmodell gelang erst kürzlich <sup>49</sup>. Hierbei zeigte sich, dass der miRNA-223 auch eine Rolle in der Regulation der Funktion reifer Granulozyten, also in der adäquaten Immunantwort zukommt.

#### **4.5 Bedeutung der miRNA-223 in der akut myeloischen Leukämie**

Tumorzellen zeichnen sich im Vergleich zu normalen Zellen unter anderem durch einen Verlust der physiologischen Zellproliferationskontrolle aus. Nach Entdeckung der Existenz eines Schaltkreises zwischen C/EBP $\alpha$  und der miRNA-223, die beide die Differenzierung myeloischer Zellen aktivieren und in der Lage sind die Proliferation zu hemmen einerseits und dem proliferationsfördernden Transkriptionsfaktor E2F1 andererseits, stellte sich die Frage nach den Folgen von Störungen in diesem Netzwerk. Ungleichgewichte zwischen Differenzierung und Proliferation können eine Plattform für die Entstehung maligner Zelltransformationen darstellen. Faktoren eines wie oben beschriebenen Schaltkreises stellen also typische Kandidaten für eine solche, die Tumorgenese fördernde Fehlregulationen dar.

Die E2F1 Überexpression ist per se ein onkogenes Ereignis, das die Prädisposition für eine maligne Transformation bewirkt <sup>87</sup>. Dieses tumorgenesefördernde Potential von E2F1 wurde bereits in verschiedenen Arbeiten belegt <sup>51,84,122</sup>.

Im Gegensatz zu diesem Onkogen konnte C/EBP $\alpha$  als Tumorsuppressor identifiziert und charakterisiert werden. In unterschiedlichen AML Subtypen fanden sich eine fehlende Expression, Dysregulationen oder Mutationen C/EBP $\alpha$  <sup>37,82,86,91</sup>. Die Bedeutung von C/EBP $\alpha$  in der Leukämogenese zeigte sich im Mausmodell, in dem Individuen, welche homozygot für eine C/EBP $\alpha$  Mutation waren, eine

Störung in der myeloischer Differenzierung von Vorläuferzellen im Knochenmark aufwiesen und innerhalb eines Jahres eine AML entwickelten<sup>54</sup>.

Eine Bedeutung ihrer Fehlregulation für die Tumorgenese konnte also für zwei Faktoren des zuvor beschriebenen Regelkreises bereits belegt werden. Da beide dieser Faktoren einen regulativen Einfluss auf die miRNA-223 Expression ausüben war anzunehmen, dass bei maligne transformierten Zellen mit dysregulierter Expression eines dieser Faktoren auch eine Störung der miRNA-223 Expression zu finden sein könnte. Aufgrund der besonderen Bedeutung der miRNA-223 für die Granulopoese stellte sich die Frage nach dem Vorhandensein einer Fehlregulation dieser miRNA in akut myeloischen Leukämien, die durch eine Störung der normalen Zelldifferenzierung charakterisiert sind.

Aufgrund der genannten Tatsachen war eine mögliche Fehlfunktion der miRNA-223 in verschiedenen Subtypen der AML, in denen eine Störung der C/EBP $\alpha$  Funktion vorliegt, zu vermuten. In der Tat wiesen entsprechende leukämische Blasten eine verminderte Expression der miRNA-223 auf. Der Vergleich der miRNA-223 Expressionslevel erfolgte dabei mit AML Subtypen, die einen normalen Karyotypen und keine Mutation oder sonstige nachweisbare Funktionsstörung C/EBP $\alpha$ s aufwiesen. Eine fehlende Funktion C/EBP $\alpha$ s wirkt sich also auch auf die Expression der miRNA-223 aus, so dass auch die durch die miRNA-223 vermittelten Funktionen bei Vorliegen einer AML mit gestörtem C/EBP $\alpha$  nicht erhalten bleiben.

Derzeit existieren keinerlei Daten zu Untersuchungen des onkogenen Potentials von E2F1 in akut myeloischen Leukämien, jedoch zeigten Experimente, dass die Überexpression von E2F1 in transgenen Mäusen tumorgenesefördernd wirkt<sup>85</sup> und dass die unkontrollierte Expression von E2F1 zu Störungen in der Differenzierung myeloischer Vorläuferzellen führt<sup>2</sup>.

Infolge der reduzierten miRNA-223 Expression ist anzunehmen, dass auch die effiziente negative Regulation seiner Zielgene ausbleibt. Diese fehlende Hemmung könnte so E2F1, und theoretisch auch weiteren, derzeit noch nicht identifizierten onkogenen Faktoren, die durch die miRNA-223 reguliert werden, eine massive Expansion und damit das Erreichen eines onkogen wirkenden Proteinlevels ermöglichen. Eine dadurch stark dominierende E2F1 Protein Präsenz wiederum würde so eine noch effektivere Hemmung der miRNA-223 Expression, im Sinne eines ‚Circulus vitiosus‘, ermöglichen.

Gemäß des in dieser Arbeit neuentdeckten, regulativen Einflusses von E2F1 auf die miRNA-223 Expression, führt solch eine ‚Entblockung‘ der E2F1 Expression also zu zwei Effekten: Zum Einen kommt es, basierend auf der beschriebenen ‚Feedback-Loop‘ Kopplung, zu einer E2F1 vermittelten Hemmung der miRNA-223 Transkription und damit fehlender E2F1 Inhibition, was folglich zu einer weiteren Steigerung der E2F1 Expression führt. Zum Anderen führt die hohe E2F1 Expression zu einem Überwiegen proliferationsfördernder Signale durch Stimulation der Zellzyklus-Progression und Aktivierung verschiedener Gene. Diese fehlende Regulation von E2F1 würde so die weitere Aufrechterhaltung der Störung der Balance zwischen Differenzierung und Proliferation und somit die maligne

Transformation fördern, mit dem Ergebnis der Akkumulation unreifer Vorläuferzellen, was wiederum einem typischen Charakteristikum der AML entspricht.

Aufgrund der vorliegenden Arbeit kann die miRNA-223, im Falle akut myeloischer Leukämien, den tumorsupprimierenden miRNAs zugeteilt werden. Dem zuvor beschriebenen Modell eines Schaltkreises zufolge (Abb.16) kann diese Funktion entweder durch eine Störung der Expression C/EBPs oder aber theoretisch auch bei Subtypen, die eine stark erhöhte E2F1 Expression aufweisen, fehlen. Die Reduktion der miRNA-223 Expression in leukämischen Blasten verschiedener AML Subtypen und die Identifikation von E2F1 als sein funktionelles Zielgen lassen annehmen, dass der Transkriptionsfaktor E2F1 auch in dieser Tumorentität eine Rolle spielt. Ob tatsächlich in AML Subtypen mit einer reduzierten miRNA-223 Expression ein entsprechend hohes E2F1 Level zu finden ist, und ob dies Folge einer fehlenden miRNA-223 Expression ist, oder aber ob eine abnorme E2F1 Expression auch Ursache einer verminderten miRNA-223 Expression in AML Subtypen sein kann, werden zukünftige Forschungsarbeiten zeigen.

#### 4.6 Perspektiven

Die aus bisherigen Arbeiten bekannten Fakten, inklusive der Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit sprechen Störungen der physiologischen miRNA-Expression eine Rolle in der Tumorentwicklung zu. Mittels verschiedener Methoden der Analyse konnten spezifische miRNA-Expressionsmuster sowohl für solide als auch für hämatologische Tumorentitäten identifiziert werden, die sich jeweils deutlich von denen des gesunden entsprechenden Gewebes unterscheiden<sup>29, 53,66,116</sup>. Desweiteren zeigen experimentelle Ergebnisse, dass auch Korrelationen zwischen dem miRNA-Expressionslevel und verschiedenen pathologischen und klinischen Parametern existieren. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass Veränderungen der miRNA-Expression auch mit unterschiedlich guten Prognosen korrelieren<sup>9,23,45,109</sup>. Die Assoziation veränderter miRNA-Expressionsmuster mit jeweils zugrundeliegenden Krankheitsbildern ist dabei oft so spezifisch, dass es denkbar ist, dass die miRNA Expressionsanalyse als völlig neues diagnostisches Werkzeug dienen könnten<sup>8,45,66,69</sup>. Dies lässt auch auf zukunftssträchtige neue Methoden der Differenzierungsmöglichkeiten in der Tumordiagnostik hoffen. Mittels speziell für humane miRNAs angefertigter Mikrochips konnten beispielsweise unterschiedlich aggressive CLL-Verläufe anhand ihres miRNA-Expressionsmusters voneinander unterschieden werden<sup>9</sup>. Inwiefern die jeweils gefundenen Veränderungen im miRNA-Expressionsmuster ursächlich für das Auftreten einer Erkrankung sind ist derzeit noch nicht geklärt und bedarf weiteren Nachforschungen.

Die steigende Zahl der Berichte über eine Rolle der miRNAs im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen, sowohl benigner, als auch maligner Art, werfen zunehmend auch die Frage auf, inwie-

fern diese Erkenntnisse auch für therapeutische Strategien genutzt werden können. Aufgrund der Tatsache, dass in unterschiedlichen Tumorentitäten sowohl miRNAs identifiziert werden konnten, die als Onkogene als auch als Tumorsuppressoren agieren können, könnte die entsprechende Regulation ihrer Expression einen neuen Therapieansatz oder eine zusätzliche Therapieoption darstellen. Da bisherige Untersuchungen ergaben, dass Krebserkrankungen vornehmlich mit reduzierten miRNA-Expressionslevel einhergehen, wird vor allem die Gabe von metabolisch stabilisierten miRNAs bzw. die Induktion der Expression dieser miRNAs anvisiert. Hierdurch erhofft man sich die fehlende tumorsupprimierende Wirkung dieser miRNAs wieder herzustellen. Umgekehrt könnte durch die spezifische Hemmung einzelner onkogener miRNAs die Normalisierung ihres Expressionslevels eine mögliche Strategie in der Behandlung von Tumorentitäten darstellen, in denen einzelne miRNAs überexprimiert vorliegen. Bisher sind, neben den schon zuvor erwähnten ‚LNAs‘, desweiteren ‚Antagomirs‘, chemisch-modifizierte, Cholesterolkonjugierte RNA-Moleküle<sup>58</sup> oder die erst kürzlich etablierte Methode der miRNA Inhibition mit Hilfe von ‚miRNA-sponges‘<sup>20</sup> für eine solche Blockierung in experimenteller Verwendung.

Im Falle der miRNA-223 könnte die Normalisierung des reduzierten Expressionslevels zur Wiederherstellung der notwendigen Inhibition onkogener Zielgene, beispielsweise von E2F1, führen. In Anbetracht der Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit könnte die Manipulation des miRNA-223 Levels speziell in bestimmten AML Subtypen mit gestörter C/EBP $\alpha$  Funktion, und möglicherweise auch bei einer erhöhten E2F1 Expression, therapierelevant sein und die derzeitige Behandlung dieser Patienten erweitern und verbessern.

## 5 Zusammenfassung

MicroRNAs sind kleine, nicht proteinkodierende RNAs, die eine erst kürzlich neuentdeckte Gruppe von Genregulatoren darstellen, die posttranskriptionell regulatorisch wirken. Die Expression der miRNA-223 ist spezifisch für die Granulopoese und wird präzise durch den Transkriptionsfaktor CCAAT enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) reguliert. Noch immer sind nicht alle Mechanismen der regulatorischen Funktionen C/EBP $\alpha$ s bekannt: Nach wie vor ist der exakte Mechanismus der, für die regelrechte Granulopoese essentiellen Inhibition von E2F1 durch C/EBP $\alpha$ , nicht vollständig geklärt..

In der vorliegenden Arbeit konnte E2F1 als neues funktionelles Zielgen der miRNA-223 identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass diese miRNA-223 mediierte Regulation von E2F1, während der granulozytären Differenzierung, einen der Mechanismen darstellt, durch den C/EBP $\alpha$  die kritische E2F1 Inhibition bewirkt. Desweiteren konnte eine zellzyklusinhibierende antiproliferative Eigenschaft der miRNA-223 nachgewiesen werden.

Eine steigende Anzahl von Studien zeigte inzwischen, dass Fehlregulationen von miRNAs die Tumorgenese fördern können. Der Verlust der regulären Expression oder Funktion von C/EBP $\alpha$  stellt ein entscheidendes Ereignis für die Entstehung akut myeloischer Leukämien darstellt. Bei Untersuchungen zur Bedeutung der miRNA-223 in der Leukämogenese konnte beobachtet werden, dass in verschiedenen AML Subtypen, die aus unterschiedlichen pathogenetischen Ursachen eine abnormale C/EBP $\alpha$  Funktion aufweisen, das Expressionslevel der miRNA-223 vermindert war.

Da für einige miRNAs und ihre Zielgene Schaltkreise mit gegenseitiger Regulation beschrieben sind, erfolgten auch Experimente zur Untersuchung der Existenz eines regulativen Einflusses von E2F1 auf die Expression der miRNA-223. Ergebnisse verschiedener Experimente lassen den Schluss zu, dass E2F1 als Repressor der miRNA-223 agiert.

Zusammenfassend liefern die Ergebnisse den Nachweis der Existenz eines, die miRNA-223 und die Transkriptionsfaktoren C/EBP $\alpha$  und E2F1 involvierenden Regelkreises, der eine wichtige Komponente des Differenzierungsprogrammes in der Granulopoese darstellt. Die Beobachtung einer antiproliferativen Aktivität der miRNA-223, sowie reduzierter miRNA-223 Expressionslevel in verschiedenen Subtypen akut myeloischer Leukämie lassen der miRNA-223 tumorsupprimierende Eigenschaften zuordnen.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Akira S, Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, Nakajima T et al.: A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *Embo J* 9 (1990) 1897-1906
- 2 Amanullah A, Hoffman B, Liebermann DA: Deregulated E2F-1 blocks terminal differentiation and loss of leukemogenicity of M1 myeloblastic leukemia cells without abrogating induction of p15INK4B and p16INK4A. *Blood* 96 (2000) 475-482
- 3 Antonson P und Xanthopoulos KG: Molecular cloning, sequence, and expression patterns of the human gene encoding CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha). *Biochem Biophys Res Commun* 215 (1995) 106-113
- 4 Bartel DP: MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116 (2004) 281-297
- 5 Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR et al.: Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33 (1976) 451-458
- 6 Berezikov E, Gurvey V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E: Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell* 120 (2005) 21-24
- 7 Birkenmeier EH, Gwynn B, Howard S, Jerry J, Gordon JI, Landschulz WH, McKnight SL: Tissue-specific expression, developmental regulation, and genetic mapping of the gene encoding CCAAT/enhancer binding protein. *Genes Dev* 3 (1989) 1146-1156
- 8 Calin GA, Croce CM: MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6 (2006) 857-866
- 9 Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, DiLeva G, Shimizu M, Wojcik SE et al.: A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 353 (2005) 1793-1801
- 10 Carthew RW: Gene regulation by microRNAs. *Curr Opin Genet Dev* 16 (2006) 203-208
- 11 Chen C-Z, Li L, Lodish HF, Bartel DP: MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303 (2004) 83-87
- 12 Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M et al.: miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *PNAS* 102 (2005) 13944-13949
- 13 Crowe DL, Ngyuen DC, Tsang KJ, Kyo S: E2F-1 represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Nucl Acids Res* 29 (2001) 2789-2794
- 14 Croxton R, Ma Y, Song L, Haura EB, Cress WD: Direct repression of the Mcl-1 promoter by E2F1. *Oncogene* 21 (2002) 1359-1369

- 15 Dahl R, Walsh JC, Lancki D, Laslo P, Iyer SR, Singh H et al.: Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1: C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol* 4 (2003) 1029-1036
- 16 D'Alo F, Johansen LM, Nelson EA, Radomska HS, Evans EK, Zhang P et al.: The amino terminal and E2F interaction domains are critical for C/EBP alpha-mediated induction of granulopoietic development of hematopoietic cells. *Blood* 9 (2003) 3163-71
- 17 Davis JN, Wolno KJ, Daignault S, Hofer MD, Kuefer R, Rubin MA et al.: Elevated E2F1 inhibits transcription of the androgen receptor in metastatic hormone-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 66 (2006) 11897-11906
- 18 DeGregori J und Johnson DG: Distinct and overlapping roles for E2F family members in transcription, proliferation and apoptosis. *Curr Mol Med* 6 (2006) 739-748
- 19 Dyson N: The regulation of E2F by pRb-family proteins. *Genes Dev* 12 (1998) 2245-2262
- 20 Ebert M, Neilson JR, Sharp AP: MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nature Meth* 4 (2007) 721-726
- 21 Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF: Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *PNAS* 102 (2005) 3627-3632
- 22 Esquela-Kerscher A und Slack FJ: Oncomirs- microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6 (2006) 259-269
- 23 Fazi F, Racanicchi S, Zardo G, Starnes LM, Mancini M, Travaglini L et al.: Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by AML1/ETO oncoprotein. *Cancer Cell* 12 (2007) 457-466
- 24 Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V, DeMarchis ML, Nervi C et al.: A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* 123 (2005) 819-831
- 25 Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F et al.: MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cells growth via kit receptor down-modulation. *PNAS* 102 (2005) 18081-18086
- 26 Fontana L, Pelosi E, Greco P, Racanicchi S, Testa U, Liuzzi F et al.: MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nat Cell Biol* 7 (2007) 775-787
- 27 Fukao T, Fukuda Y, Kiga K, Sharif J, Hino K, Enomoto Y et al.: An evolutionarily conserved mechanism for microRNA-223 expression revealed by microRNA gene profiling. *Cell* 129 (2007) 617-631

- 28 Galloway JL und Zon LI: Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in vertebrate embryo. *Curr Top Dev Biol* 53 (2003) 139-158
- 29 Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, Iuliano R, Cimmino A, Aqeilan R et al.: MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *PNAS* 103/13 (2006) 5078-5083
- 30 Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F et al.: MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 111 (2008) 3183-3189
- 31 Guibal F, Radomska HS, Johansen LM, Tenen DG: C/EBPalpha is deregulated by PML-RAR in Acute Promyelocytic Leukemia. *Blood* 106 (2005) ASH abstract 3015
- 32 Guy CT, Zhou W, Kaufman S, Robinson MO: E2F-1 blocks terminal differentiation and causes proliferation in transgenic megakaryocytes. *Mol Cell Biol* 16 (1996) 685
- 33 Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J et al.: The World Health Organization Classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie house, VA, November 1997. *J Clin Oncol.* 17 (1999) 3835-3849
- 34 Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S et al.: A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92 is over expressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 65 (2005) 9628-9632
- 35 He L und Hannon GJ: MicroRNAs: small RNAs with big role in gene regulation. *Nature* 5 (2004) 522-531
- 36 He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM: A microRNA polycistron as a potential human onkogene. *Nature* 435 (2005) 828-833
- 37 Herold G und Mitarbeiter: Innere Medizin - Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Auflage 2008, Herold-Verlag, Köln, 2008, S82-88
- 38 Hiddemann W: Akut Myeloische Leukämie. In: Seeber S, Schütte J (Hrsg.): Therapiekonzepte Onkologie. 3. Auflage, Springer Verlag Berlin, 1998, S163-179
- 39 Hirai H, Zhang P, Dayaram T, Hetherington C J, Mizuno S, Imanishi J et al.: C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis. *Nat Immunol* 7 (2006) 732-739
- 40 Hobert O: Common logic of transcription factor and microRNA action. *Trends Biochem Sci* 29/9 (2004) 462-468
- 41 Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, Traver D, Bronson RT, Cameron S et al.: Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity* 18 (2003) 109-120

- 42 Holtschke T, Lohler J, Kanno Y, Fehr T, Giese N, Rosenbauer F et al.: Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene. *Cell* 87 (1996) 307-317
- 43 Hossain A, Kuo MT, Saunders GF: Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Mol Cell Biol* 21 (2006) 8191-201
- 44 Huntly BJ, Gilliland DG: Leukemia stem cell and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer* 5 (2005) 311-321
- 45 Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronesi A, Spizzo R, Sabbioni S: MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 65 (2005) 7065-7070
- 46 Iwama A, Osawa M, Hirasawa R, Uchiyama N, Kaneko S, Onodera M et al.: Reciprocal roles for CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) and PU.1 transcription factors in Langerhans cell commitment. *J Exp Med* 195 (2002) 547-558
- 47 Johansen LM, Iwama A, Lodie TA, Sasaki K, Felsner DW, Golub TR et al.: c-Myc is a critical target for C/EBPalpha in granulopoiesis. *Mol Cell Biol* 21 (2001) 3789-38006
- 48 John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS: Human MicroRNA Targets. *PLoS Biol* 2 (2004) 1862-1879
- 49 Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler TR, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O et al.: Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature* 451 (2008) 1125-1129
- 50 Johnson DG, Cress WD, Jakoi L, Nevins JR: Oncogenic capacity of the E2F-1 gene. *PNAS* 91 (1994) 12823-12827
- 51 Johnson PF: Molecular stop signs: regulation of cell-cycle arrest by C/EBP transcription factors. *J Cell Sci* 118 (2005) 2545-2555
- 52 Johnston RJ Jr, Chang S, Etchberger JF, Ortiz CO, Horbert O: MicroRNAs acting in a double feedback loop to control a neuronal cell fate decision. *PNAS* 102 (2005) 12449-12454
- 53 Kim VN, Nam J-W: Genomic of microRNA. *Trends Genet* 22/3 (2006) 165-173
- 54 Kirstetter P, Schuster MB, Bereshchenko O, Moore S, Dvinge H, Kurz E et al.: Modeling C/EBPalpha mutant acute myeloid leukemia reveals a common expression signature of committed myeloid leukemia-initiating cells. *Cell* 13 (2008) 299-310
- 55 Klemsz MJ, McKercher SR, Celada A, Van Beveren C, Maki RA: The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell* 61 (1990) 113-124
- 56 Kovacs KA, Steinmann M, Magistretti PJ, Halfon O, Cardinaux JR: CCAAT/enhancer-binding protein family members recruit the coactivator CREB-binding protein and trigger its phosphorylation. *J Biol Chem* 278 (2003) 36959-36965

- 57 Kroczak M, Krek W, Nagamine Y: Pocket protein-independent repression of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 gene expression by E2F1. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 2014-2022
- 58 Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M et al.: Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs'. *Nature* 438 (2005) 637-639
- 59 La Thangue NB: The yin and yang of E2F-1: balancing life and death. *Nat Cell Biol* 5/7 (2003) 587-589
- 60 Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL: The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240 (1988) 1759-1764
- 61 Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, Lehmann-Che J, Eyquem S, Himber C et al.: A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* 308 (2005) 557-560
- 62 Lewis BP, Burge CB, Bartel DP: Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120 (2005) 15-20
- 63 Lewis BP, Shih I, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB: Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell* 115 (2003) 787-798
- 64 Lin FT, MacDougald OA, Diehl AM, Lane MD: A 30-kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein alpha message: transcriptional activator lacking antimitotic activity. *PNAS* 90 (1993) 9606-9610
- 65 Löwenberg B, Downing JR, Burnett A: Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 341 (1999) 1051-1062
- 66 Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A et al.: MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435 (2005) 834-838
- 67 Matsumara I, Tanaka H, Kanakura Y: E2F1 and c-Myc in cell growth and death. *Cell Cycle* 2 (2003) 333-338
- 68 McKnight SL: McBindall- a better name for CCAAT/enhancer binding proteins? *Cell* 107 (2001) 259-261
- 69 Meltzer PS: Small RNAs with big impacts. *Nature* 435 (2005) 745-746
- 70 Mittnacht S: Control of pRb phosphorylation. *Curr Opin Genet Dev* 8 (1998) 21-27
- 71 Muller C, Calkhoven CF, Sha X, Leutz A: The CCAAT enhancer -binding protein alpha (C/EBPalpha) requires a SWI/SNF complex for proliferation arrest. *J Biol Chem* 279 (2004) 7353-7358
- 72 Nerlov C, Ziff EB: CAAT/enhancer binding protein-alpha amino acid motifs with dual TBP and TFIIB binding ability co-operate to activate transcription in both yeast and mammalian cells. *Embo J* 14 (1995) 4318-4328

- 73 O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT: c-Myc regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435 (2005) 839-843
- 74 Oelgeschlager M, Nuchprayoon I, Luscher B, Friedman AD: C/EBP, c-Myb and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter. *Mol Cell Biol* 16 (1996) 4717-4725
- 75 Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR: AML, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84 (1996) 321-330
- 76 Orkin SG, Zon LI: Hematopoiesis: An evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132 (2008) 631-644
- 77 Ossipow V, Descombes P, Schibler U: CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *PNAS* 90 (1993) 8219-8223
- 78 Othani K, DeGregori J, Nervins JR: Regulation of the cyclin E gene by the transcription factor E2F-1. *PNAS* 92 (1995) 12146-12150
- 79 Pabst T, Mueller BU, Harakawa N, Schoch C, Haferlach T, Behre G et al.: AML1-ETO down regulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat Med* 7 (2001a) 444-451
- 80 Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S et al.: Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha) in acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 27 (2001b) 263-270
- 81 Pedersen TA, Kowenz-Leutz E, Leutz A, Nerlov C: Cooperation between C/EBPalpha TBP/TFIIB and SWI/SNF recruiting domains is required for adipocyte differentiation. *Genes Dev* 15 (2001) 3208-3216
- 82 Perotti D, Cesi V, Trotta R, Guerzoni C, Santilli G, Campell K et al.: BCR-ABL suppresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2. *Nat Genet* 30 (2002) 48-58
- 83 Petrocca F, Visone R, Onelli MR, Shah MH, Nicoloso MS, deMartino I et al.: E2F1-regulated microRNAs impair TGF-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell* 13 (2008) 272-286
- 84 Pierce AM, Gimenez-Conti IB, Schneider-Broussard R, Martinez LA, Conti CJ, Johnson DG: Increased E2F1 activity induces skin tumors in mice heterozygous and nullizygous for p53. *PNAS* 95 (1998) 8858-63.
- 85 Pierce AM, Schneider-Broussard R, Gimenez-Conti IB, Russel JL, Conti CJ, Johnson DG: E2F-1 has both oncogenic and tumour-suppressive properties in transgenic model. *Mol Cell Biol* 19 (1999) 6408-14.

- 86 Porse BT, Bryder D, Theilgaard-Monch K, Hasemann MS, Anderson K, Damgaard I et al.: Loss of C/EBPalpha cell cycle control increases myeloid progenitor proliferation and transforms the neutrophil granulocyte lineage. *J Exp Med* 202 (2005) 85-96
- 87 Porse BT, Pedersen TA, Xu X, Lindberg B, Wewer UM, Friie-Hansen L et al.: E2F repression by C/EBPalpha is required for adipogenesis and granulopoiesis *in vivo*. *Cell* 107 (2001) 247-258
- 88 Radomska HS, Basseres DS, Zheng R, Zhang P, Dayaram T, Yamamoto Y et al.: Block of C/EBP alpha function by phosphorylation in acute myeloid leukemia with FIt3 activating mutations. *J Exp Med* 203 (2006) 371-381
- 89 Radomska HS, Huettner CS, Zhang P, Cheng T, Scadden DT, Tenen DG : CCAAT/enhancer binding protein is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bio-potential myeloid progenitors. *Mol Cell Biol* 18 (1998) 4301-43414
- 90 Ramkissoon SH, Mainwaring LA, Ogasawara Y, Keyvanfar K, McCoy Jr JP, Slaond EM et al.: Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. *Leuk Res* 30 (2006) 643-647
- 91 Rangatia J, Vangala RK, Treiber N, Zhang P, Radomska H, Tenen DG et al.: Downregulation of c-Jun expression by transcription factor C/EBPalpha is critical for granulocytic lineage commitment. *Mol Cell Biol* 22 (2002) 8681-8694
- 92 Reddy VA, Iwama A, Iotzova G, Schulz M, Elsaesser A, Vangala RK et al.: Granulocytic inducer C/EBPalpha inactivates the myeloid master regulator PU.1: possible role in lineage commitment decisions. *Blood* 100 (2002) 483-490
- 93 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF , Weissman IL: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414 (2001) 105-111
- 94 Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR et al.: Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 316 (2007) 608-611
- 95 Roman C, Platero JS, Shuman J, Calame K: Ig/EBP-1: a ubiquitously expressed immunoglobulin enhancer binding protein that is similar to C/EBP and heterodimerizes with C/EBP. *Genes Dev* 4 (1990) 1404-1415
- 96 Rosenbauer F, Tenen DG: Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol* 7 (2007) 105-117
- 97 Rosenbauer F, Koschmieder S, Steidl U, Tenen DG: Effect of transcription-factor concentrations on leukemic stem cells. *Blood* 106 (2005) 1519-1524
- 98 Rowland BD, Bernards R: Re-evaluating cell cycle regulation. *Cell* 127 (2006) 871-874
- 99 Sarnow P, Joplig CL, Norman KL, Schütz S, Wehner KA: MicroRNAs: expression, avoidance and subversion by vertebrate viruses. *Nat Rev Microbiol* 4 (2006) 651-659

- 100 Schuster MB, Porse BT: C/EBPalpha: a tumour suppressor in multiple tissues? *Biochem Biophys Acta* 1766 (2006) 88-103
- 101 Shalgie R, Lieber D, Oren M, Pilpel Y: Global and local architecture of mammalian microRNA-transcription factor regulatory network. *PLoS Biol* 3/7 (2007) 1291-1304
- 102 Shivdasani RA, Mayer EL, Orkin SH: Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 373 (1995) 432-434
- 103 Shivdasani RA: MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood* 12 (2006) 3646-53
- 104 Slomiany BA, D'Arigo KI, Kelly MM, Kurtz DT: C/EBPalpha inhibits cell growth via direct repression of the E2F-DP-mediated transcription. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 5986-5997
- 105 Stevens C, La Thangue NB: E2F and cell cycle control: a double-edge sword. *Arch Biochem Biophys* 412 (2003) 157-169
- 106 Stevens C, Smith L, La Thangue NB: *Nat Cell Biol* 5 (2003) 401-409
- 107 Strom DK, Cleveland JL, Chellappan S, Nip J, Hiebert SW: E2F-1 and E2F-3 are functionally distinct in their ability to promote myeloid cell cycle progression and block granulocyte differentiation: *Cell Growth Differ* 9 (1998) 59-69
- 108 Sylvestre Y, DeGuire V, Querido E, Mukhopadhyay UK, Bourdeau V, Major F et al.: An E2F/miR-20a auto-regulatory feed-back loop. *JBC* 4 (2007) 2135-43
- 109 Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H et al.: Reduced expression of let-7 MicroRNA in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 64 (2004) 3753-3756
- 110 Tanaka T, Akira S, Yoshida K, Umenoto M, Yoneda Y, Shirafuji N, Fujiwara H, Suematsu S, Yoshida N, Kishimoto T: Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell* 80(1995) 353-361
- 111 Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H: Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *PNAS* 104/39 (2007) 15472-15477
- 112 Tenen DG: Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* 3 (2003) 89-101
- 113 Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE: Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* 90 (1997) 489-519
- 114 Timchenko NA, Wilde M, Darlington GJ: C/EBPalpha regulates formation of S-phase specific E2F-p107 complexes in livers of newborn mice. *Mol Cell Biol* 19 (1999) 2936-2945

- 115 Umek RM, Friedman A, McKnight SL: CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science* 251 (1991) 288-292
- 116 Volinia S, Calin GA, Liu C-G, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F et al.: A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *PNAS* 103/7 (2006) 2257-2261
- 117 Wang C, Chen X, Wang Y, Gong J, Hu G: C/EBP $\alpha$ -30 plays transcriptional regulatory roles distinct from C/EBP $\alpha$ -p42. *Cell Res* 17 (2007) 374-83
- 118 Wang H, Iakova P, Wilde M, Welm A, Goode T, Roesler WJ et al.: C/EBP $\alpha$  arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Mol Cell* 8 (2001) 817-828
- 119 Woods K, Thomson JM, Hammond SM: Direct regulation of an oncogenic microRNA cluster by E2F transcription factors. *JBC* 282/4 (2007) 2130-2134
- 120 Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J et al.: MiR-150 controls B-cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell* 131 (2007) 146-159
- 121 Yamanaka R, Barlow C, Lekstrom-Himes J, Castilla LH, Liu PP, Eckhaus M et al.: Impaired granulopoiesis, myelodysplasia, and early lethality in CCAAT/enhancer binding protein epsilon-deficient mice. *PNAS* 94 (1997) 13187-13192
- 122 Yamasaki L, Bronson R, Williams BO, Dyson N, Harlow E, Jacks T: Loss of E2F-1 reduces tumorigenesis and extends the lifespan of Rb $^{+/-}$  mice. *Nat Genet* 18 (1998) 360-364
- 123 Yekta S, Shih I, Bartel DP: MicroRNA-Directed Cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304 (2004) 594-596
- 124 Yoo AS, Greenwald I: LIN-12/Notch activation leads to microRNA-mediated down-regulation of Vav in *C.elegans*. *Science* 310 (2005) 1330-1333
- 125 Zhang DE, Hetherington CJ, Meyers S, Rhoades KL, Larson CJ, Chen HM et al.: CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF  $\alpha$ 2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter. *Mol Cell Biol* 16 (1996a) 1231-1240
- 126 Zhang DE, Zhang P, Wang ND, Hetherington CJ, Darlington GJ, Link DC et al.: Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *PNAS* 94 (1997) 569-574
- 127 Zhang P, Iwama A, Datta MW, Darlington GJ, Link DC, Tenen DG: Up regulation of interleukin 6 and granulocyte colony-stimulating factor receptors by transcription factor CCAAT enhancer binding protein alpha (C/EBP $\alpha$ ) is critical for granulopoiesis. *J Exp Med* 188 (1998) 1173-1184
- 128 Zhang P, Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, Fenyus ML, Dayaram T, Owens BM et al.: Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP $\alpha$ . *Immunity* 21 (2004) 853-863

- 129 Zhang W, Dahlberg JE, Tam W: MicroRNAs in Tumorigenesis: A Primer. *Am J Pathol* 171 (2007) 728-738
- 130 Zhao Y, Samal E, Srivastava D: Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 436 (2005) 214-220

## 7 Thesen

- 1 Eine Störung der normalen Zelldifferenzierung ist eine wichtige Komponente in der Pathogenese vieler Tumoren.
- 2 Bei der AML führt die Entartung der hämatopoetischen Vorläuferzelle nicht nur zum Verlust ihrer Differenzierungsfähigkeit, sondern auch zur Proliferationssteigerung.
- 3 Spezifische hämatopoetische Transkriptionsfaktoren spielen für die normale Differenzierung der Vorläuferzellen der einzelnen Zelllinien eine äußerst wichtige, kritische Rolle und werden durch spezifische Expressions- und Proteininteraktionsmuster kontrolliert.
- 4 Dieselben Transkriptionsfaktoren weisen bei der AML häufig eine gestörte Expression auf. Einer der dabei oft betroffenen Transkriptionsfaktoren ist C/EBP $\alpha$ . Das Fehlen C/EBP $\alpha$ s führt zum Auftreten von Störungen der Zelldifferenzierung. C/EBP $\alpha$  wird daher als Tumorsuppressor klassifiziert.
- 5 C/EBP $\alpha$  ist essentiell für die granulozytäre Differenzierung. Gleichzeitig ist die Inhibition proliferierender Signale durch C/EBP $\alpha$  von großer Bedeutung. Besonders kritisch ist dabei die Hemmung des proliferationsfördernden Transkriptionsfaktors E2F1.
- 6 E2F1 induziert die Expression von Genen, die für die Zellzyklusprogression benötigt werden. Desweiteren zeigt E2F1 in verschiedenen Geweben ein onkogenes Potential und ist in der Lage andere, ebenfalls als Onkogen fungierende Faktoren zu aktivieren.
- 7 Neben viel untersuchten Transkriptionsfaktoren existiert eine erst kürzlich entdeckte weitere Klasse von Genregulatoren, die sogenannten microRNAs (miRNAs). Sie beeinflussen als posttranskriptionell negative Regulatoren ein weites Feld biologischer Funktionen wie die Zellproliferation, die Differenzierung und die Apoptose.
- 8 Neueste Untersuchungen deuten darauf hin, dass miRNAs sowohl als Tumorsuppressoren als auch als Onkogene fungieren können.
- 9 Die miRNA-223 ist eine, die spezifisch in Zellen des hämatopoetischen Systems exprimierten miRNAs. Ihre Expression wird durch myeloische Transkriptionsfaktoren reguliert. Der für die Granulopoese essentielle Transkriptionsfaktor C/EBP $\alpha$  induziert die miRNA-223 Expression während der granulozytären Differenzierung. Dies betrifft besonders die frühe Granulopoese.

- 10 Die miRNA-223 ist ein wichtiger Faktor für den regulären Ablauf der Granulopoese. Ein Fehlen ihrer regulären Expression führt zu Störungen in der Differenzierung myeloischer Vorläuferzellen. In der vorliegenden Arbeit zeigte die Untersuchung verschiedener AML Subtypen, in denen eine Funktionsstörung C/EBP $\alpha$ s vorliegt auch ein stark reduziertes Expressionslevel der miRNA-223.
- 11 Durch Sequenzanalyse, Überexpressions- und ‚Knockdown‘- Experimente, sowie durch Luziferase Assays konnte E2F1 als ein neues funktionelles Zielgen der miRNA-223 identifiziert werden. E2F1 wird durch die miRNA-223 auf translationaler Ebene durch direkte Interaktion mit der 3'UTR der E2F1 mRNA inhibiert.
- 12 Neben der bereits beschriebenen und in dieser Arbeit bestätigten differenzierungsfördernden Funktion der miRNA-223 konnte auch eine antiproliferative Eigenschaft nachgewiesen werden. In verschiedenen Experimenten zur Proliferation konnte ein inhibierender Effekt der miRNA-223 auf die Zellzyklusprogression festgestellt werden.
- 13 Neben der Inhibition der Translation von E2F1 durch die miRNA-223, konnte auch ein regulativer Einfluss von E2F1 auf die miRNA-223 Expression gezeigt werden. Mittels Überexpressionsexperimenten, sowie Promotor Assays für den Ppri-miRNA-223-Promotor konnte belegt werden, dass E2F1 über einen negativen Feedback-Loop die Transkription der miRNA-223 reguliert.
- 14 Die Gegenspieler C/EBP $\alpha$  und E2F1 üben beide einen regulativen Einfluss auf die miRNA-223 aus. Folglich kann sowohl ein Verlust der normalen Funktion C/EBP $\alpha$ s, als auch eine erhöhte Expression von E2F1, beides häufig vorkommende Charakteristika maligner Transformation, eine Störung der miRNA-223 Expression verursachen.
- 15 Die neuen Kenntnisse über Störungen der Expression einzelner miRNAs in verschiedenen Tumorentitäten, und speziell hier die Rolle der miRNA-223 in die Pathogenese der AML, weisen sowohl ein Potential für die Verwendung von miRNAs als neue diagnostische Werkzeuge als auch für zukünftige miRNA-basierte Therapieansätze auf.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Viola Dengler  
 Nationalität: Deutsch  
 Geburtsdatum: 10.05.1983  
 Geburtsort : Freiburg i.Br.

### Ausbildung:

09/1993-06/2002  
 06/2002 Schulausbildung am Faust-Gymnasium, Staufen i.Br.  
 Abitur

10/2002-08/2009 Studium der Humanmedizin an der  
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

09/2004 1. Staatsexamen (Physikum)

06/2009 2. Staatsexamen

### Praktisches Jahr:

02/2008-06/2008 1. PJ-Tertial: Universitätsklinikum Halle,  
 Klinik für Herz-Thoraxchirurgie

06/2008-09/2008 2. PJ-Tertial: Inselspital Bern,  
 Medizinische Onkologie

09/2008-01/2009 3. PJ-Tertial: Universitätsspital Zürich,  
 Institut für Anästhesiologie

**Praktika/ Famulaturen:**

- 08/2002                      Pflegepraktikum, Klinik für Innere Medizin, Bethesda Allgemeines Krankenhaus, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Hamburg
- 07/2003-08/2003           Pflegepraktikum    Kardiochirurgie, Herzzentrum Bad Krozingen
- 03/2005                      Famulatur Unfallchirurgie, Unfallklinik Dr. Becker, Bad Krozingen
- 08/2005-09/2005           Allgemeinmedizin, Innere Medizin  
(Praxisfamulaturen im Raum Freiburg i.Br.)
- 02/2006-03/2006           Famulatur Klinik für Innere Medizin IV- Hämatologie/Onkologie, Universitätsklinikum Halle
- 02/2007-04/2007           Famulatur Klinik für Innere Medizin IV- Landeszentrum für Zell-und Gentherapie Sachsen Anhalt, Universitätsklinikum Halle

**Doktorarbeit:**

- 09/2006-07/2009           Promotion am Landeszentrum für Zell-und Gentherapie Sachsen Anhalt, Universitätsklinikum Halle, Klinik für Innere Medizin IV, Prof. Dr.med. Schmoll, unter Leitung von PD Dr. Gerhard Behre, Thema: „Das molekulare Netzwerk zwischen der miRNA-223, E2F1 und C/EBP $\alpha$  in der Granulopoese und in der akut myeloischen Leukämie.“

**Wissenschaftliche Tätigkeiten:**

- 09/2006-09/2007           Einjähriges Stipendium der Deutschen Krebshilfe
- 10/2007                      Teilnahme an der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO), Basel, Switzerland.  
Posterpräsentation: "The significance of peptidyl-prolyl cis/trans isomerase, PIN1 in Acute Myeloid Leukemia with C/EBP $\alpha$  mutation." (Zweitautor)
- 12/2007                      Teilnahme am amerikanischen Kongress der Hämato-/Onkologen (49<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Hematology in Atlanta, Georgia, USA). Vortrag: "The significance of peptidyl-prolyl cis/trans isomerase, PIN1 in Acute Myeloid Leukemia with C/EBP $\alpha$  mutation." (Zweitautor)

- 06/2008 Vortrag am europäischen Hämatologenkongress 2008 (13th Congress of the European Hematology Association (EHA) Copenhagen, Denmark): „MicroRNA-223 inhibits E2F1 during Granulopoiesis and is downregulated in AML.“ (Erstautor) Autoren: Viola Dengler, John Anto Pulikkan, Abdul Peerzada, Carsten Müller-Tidow, Stefan Bohlander, Daniel G. Tenen, Gerhard Behre
- 12/2008 Posterpräsentation, am amerikanischen Kongress der Hämato-/Onkologen (50<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Hematology ,in San Francisco, California, December 6-9, 2008): „A Molecular Network Comprising MicroRNA-223, E2F1 and C/EBP $\alpha$  in Granulopoiesis and in Acute Myeloid Leukemia.“ (Erstautor) Autoren: Viola Dengler, John Anto Pulikkan, Abdul Peerzada, Carsten Müller-Tidow, Stefan Bohlander, Daniel G. Tenen, Gerhard Behre
- 12/2008 ASH Travel Award 2008

Halle, 27.07.2009

Viola Dengler

**Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für die Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Halle, 27.07.2009

Viola Dengler

**Erklärung über bisherige Promotionsversuche**

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich erkläre, dass ich keine früheren Promotionsversuche unternommen habe und dass an keiner anderen Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

Halle, 27.07.2009

Viola Dengler

## Publikationen von Ergebnissen der Arbeit

- **„MicroRNA-223 inhibits E2F1 during Granulopoiesis and is downregulated in AML.”** Autoren: Viola Dengler (Erstautor), John Anto Pulikkan (Erstautor), Abdul Peerzada, Carsten Müller-Tidow, Stefan Bohlander, Daniel G. Tenen, Gerhard Behre.  
Vortrag am europäischen Hämatologenkongress 2008 (13<sup>th</sup> Congress of the European Hematology Association (EHA) Copenhagen, Denmark)
- **„A Molecular Network Comprising MicroRNA-223, E2F1 and C/EBP $\alpha$  in Granulopoiesis and in Acute Myeloid Leukemia.”**  
Autoren: Viola Dengler (Erstautor), John Anto Pulikkan (Erstautor), Abdul Peerzada, Carsten Müller-Tidow, Stefan Bohlander, Daniel G. Tenen, Gerhard Behre.  
Posterpräsentation am amerikanischen Kongress der Hämato-/Onkologen (50<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Hematology ,in San Francisco, California, December 6-9, 2008)
- **„A Molecular Circuitry Comprising MicroRNA-223, E2F1 and C/EBP $\alpha$  in Granulopoiesis and in Acute Myeloid Leukemia.”**  
Autoren: Viola Dengler (Erstautor), John Anto Pulikkan (Erstautor), Abdul Peerzada, Carsten Müller-Tidow, Stefan Bohlander, Daniel G. Tenen, Gerhard Behre.  
Posterpräsentation am europäischen Hämatologenkongress 2009 (14<sup>th</sup> Congress of the European Hematology Association (EHA) Berlin, Germany)

Halle, 27.07.2009

Viola Dengler

## Weitere Publikationen von Ergebnissen der Arbeit

- **"Cell cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia".**

Autoren: John A. Pulikkan\*, Viola Dengler\*, Philomina S. Peramangalam, Abdul A. Peer Zada, Carsten Müller-Tidow, Stefan K. Bohlander, Daniel G. Tenen, Gerhard Behre. **BLOOD**, in press.

- **"The Interplay Between microRNA-223 and E2F1 Regulates Cell Cycle Control during Granulopoiesis."**

Autoren: John A. Pulikkan\*, Viola Dengler\*, Philomina S. Peramangalam, Abdul A. Peer Zada, Carsten Müller-Tidow, Stefan K. Bohlander, Daniel G. Tenen, Gerhard Behre.

Vortrag am amerikanischen Kongress der Hämato-/Onkologen (51<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Hematology in New Orleans, December 6-9, 2009)

(\* kennzeichnet gleichberechtigte Erstautorschaft)

Frankfurt, 10.11.2009

Viola Dengler

## Danksagung

Nach Abschluss der vorliegenden Arbeit bedanke ich mich herzlich bei all denjenigen, die mir die Durchführung dieser ermöglicht haben und mich auf verschiedenste Art und Weise bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schmoll, Direktor der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Ermöglichung der Durchführung meiner Dissertation an seiner Klinik, für die Zurverfügungstellung der Räumlichkeiten, Materialien und Geräte bedanken.

Ich danke meinem Betreuer OA PD Dr. Gerhard Behre für die Überlassung des Themas, seine wissenschaftliche Anleitung und fachliche Unterstützung während der Erstellung meiner Dissertation.

Ganz besonders danke ich dem Wissenschaftler und Freund John Anto Pulikkan, der meine Begeisterung für die wissenschaftliche Arbeit erkannt und intensiv, mit überdurchschnittlich großem Engagement und viel Geduld gefördert hat, und dessen umfassende bereitwillige Einführung und Vertrautmachung mit der Welt der Wissenschaft und Forschung meine zukünftigen Tätigkeiten in diesem Bereich geprägt haben.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mir jederzeit Verständnis für meine Begeisterung für die Forschung entgegenbrachten. Ich danke meinen Eltern und Großeltern für die kompromisslose und unter anderem auch finanzielle Unterstützung meiner wissenschaftlichen Tätigkeiten. Ich danke meinem Freund Niels für sein unendlich großes Verständnis, seine Geduld und die vielen Entbehrungen, sowie für seine ausdauernde Unterstützung während der Zeit meiner Tätigkeit im Labor und der Anfertigung der hier vorliegenden Arbeit.