

**MiR-181a/miR-181b-vermittelte Repression des
Tumorsuppressors RASSF1A in der PML/RAR α -
assoziierten akuten Promyelozytenleukämie**

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Daniela Bräuer-Hartmann

geb. am 04.07.1979 in Marienberg/Erzgebirge

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Gerhard Behre
2. Prof. Dr. rer. nat. Sven-Erik Behrens
3. Prof. Dr. med. Carsten Müller-Tidow

Tag der öffentlichen Verteidigung: 12.05.2016

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	i
Tabellenverzeichnis	iii
Abkürzungsverzeichnis	iv
1 Einleitung.....	1
1.1 Die adulte Hämatopoese	1
1.2 Leukämie: Deregulation der Hämatopoese.....	3
1.2.1 Akute myeloische Leukämie	4
1.2.2 Akute Promyelozytenleukämie.....	7
1.3 MicroRNAs.....	10
1.3.1 Biogenese und Funktion	11
1.3.2 MicroRNAs in der Hämatopoese.....	14
1.3.3 MicroRNAs in der Leukämie	14
1.3.4 Die miR-181-Genfamilie.....	15
1.4 Der Tumorsuppressor RASSF1A.....	18
1.5 Motivation der Arbeit	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Materialien	22
2.1.1 Geräte.....	22
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	23
2.1.3 Software.....	23
2.1.4 Reagenzien.....	23
2.1.5 Biologisches Material	29
2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Zellkultur	33
2.2.2 Isolation CD34+ Progenitorzellen	33

2.2.3	Bestimmung der Zellzahl	33
2.2.4	Zytozentrifugation und May-Grünwald-Giemsa-Färbung	34
2.2.5	Differenzierung der Zellen.....	34
2.2.6	Induktion des PML/RAR α -Fusionsproteins	35
2.2.7	Proliferationsassay.....	35
2.2.8	CFU-Assay und Koloniegrößenbestimmung.....	35
2.2.9	Replating-Assay.....	36
2.2.10	Durchflusszytometrie (FACS).....	36
2.2.11	RNA-Extraktion	38
2.2.12	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	38
2.2.13	cDNA-Synthese	39
2.2.14	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	39
2.2.14.1	Semiquantitative PCR.....	40
2.2.14.2	Quantitative Real-Time PCR.....	40
2.2.14.3	MicroRNA-Quantifizierung mittels qPCR.....	41
2.2.15	Agarose-Gelelektrophorese	41
2.2.16	Klonierung.....	42
2.2.17	<i>In-vitro</i> -Mutagenese	43
2.2.18	Transiente Transfektion mittels Elektroporation	44
2.2.19	Lentivirus-Herstellung und virale Transduktion	44
2.2.20	Luziferase-Reporter-Assay	46
2.2.21	Isolation von Proteinen und Konzentrationsbestimmung nach Bradford	46
2.2.22	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen.....	47
2.2.23	Western Blot	48
2.2.24	Statistik	49
3	Ergebnisse.....	50

3.1	ATRA führt zur Reduktion der miR-181a/miR-181b-Expression in APL-Zellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	50
3.1.1	ATRA führt zur granulozytären Differenzierung von APL-Blasten und differenziellen Expression der miR-181 Familie <i>in vitro</i>	50
3.1.2	Die ATRA-vermittelte Reduktion der miR-181a/miR-181b-Expression ist APL-spezifisch	52
3.1.3	Verminderte miR-181a/miR-181b-Expression in APL-Patienten nach ATRA-Therapie.....	53
3.1.4	Apoptose-induzierende Agenzien haben keinen Einfluss auf die miR-181a/miR-181b-Expression.....	54
3.2	PML/RAR α induziert die miR-181a/miR-181b-Expression <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	57
3.2.1	Induktion der miR-181a/miR-181b-Expression in Abhängigkeit von PML/RAR α	57
3.2.2	Verstärkte Expression des miR-181a/miR-181b-Clusters in APL-Patienten und PML/RAR α - <i>knock in</i> -Mäusen.....	59
3.3	Das miR-181a/miR-181b-Cluster ist essentiell für die Aufrechterhaltung der APL.....	61
3.3.1	Blockierung des miR-181a/miR-181b-Clusters induziert Apoptose in NB4-Zellen	61
3.3.2	Blockierung des miR-181a/miR-181b-Clusters in NB4-Zellen inhibiert die Fähigkeit zur Koloniebildung.....	63
3.3.3	Reduziertes Wachstum von NB4-Zellen infolge der Inhibierung von miR-181a und miR-181b	65
3.3.4	Intrazelluläre miR-181a- und miR-181b- Anreicherung inhibiert die ATRA-induzierte Differenzierung von NB4-Zellen	66
3.4	Der Tumorsuppressor RASSF1A ist ein direktes Ziel von miR-181a und miR-181b.....	68
3.4.1	Identifikation putativer miR-181-Bindestellen in der 3'UTR des Tumorsuppressors RASSF1A.....	68

3.4.2	Das miR-181a/miR-181b-Cluster reguliert die RASSF1A Proteinmenge.....	70
3.4.3	Direkte Bindung von miR-181a und miR-181b an die RASSF1A 3'UTR	71
3.5	Spezifische Suppression des RASSF1A-Proteins in der PML/RAR α -assozierten APL.....	73
3.6	RASSF1A induziert Apoptose in NB4-Zellen	76
3.7	RASSF1A ist essentiell für die ATRA-abhängige Differenzierung von NB4-Zellen	76
3.8	Das miR-181a/miR-181b-Cluster und RASSF1A modulieren den Zellzyklus durch die Regulation von Cyclin D1	78
3.8.1	RASSF1A ist ein negativer Regulator des Zellzyklusproteins Cyclin D1	79
3.8.2	Die miR-181a/miR-181b-vermittelte Induktion von Cyclin D1 ist RASSF1A abhängig	80
4	Diskussion	82
4.1	APL-spezifische Expression und Funktion des miR-181a/miR-181b-Clusters.	82
4.2	RASSF1A als neuer differenzierungsassoziierter Faktor in der APL	88
4.3	Funktionelle Relevanz der miR-181a/miR-181b-RASSF1A-Interaktion bei der Deregulation des Zellzykluses in der APL.....	91
4.4	Ausblick	93
5	Zusammenfassung.....	96
6	Literaturverzeichnis	98
7	Anhang.....	124
	Selbstständigkeitserklärung	125
	Erklärung über bisherige Promotionsversuche.....	126
	Danksagung	127
	Lebenslauf	128
	Publikationen	130

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Modell der hämatopoetischen Entwicklungshierarchie.....	2
Abbildung 2	Schematische Darstellung der PML/RAR α -Genese.....	8
Abbildung 3	Klassisches Modell der APL-Pathogenese.....	9
Abbildung 4	Schematische Darstellung der microRNA-Prozessierung.	13
Abbildung 5	Genomische Organisation des miR-181a/miR-181b-Clusters.....	16
Abbildung 6	ATRA führt zur molekularen und morphologischen Differenzierung von APL-Zellen.....	51
Abbildung 7	ATRA-abhängige Expressionsminderung der miR-181-Genfamilie in NB4-Zellen.	52
Abbildung 8	ATRA führt zur spezifischen Erniedrigung der miR-181a/miR-181b-Expression in NB4-Zellen.	53
Abbildung 9	Verminderte miR-181a/miR-181b-Expression im Knochenmark bzw. peripheren Blutzellen von APL-Patienten nach ATRA-Therapie.	54
Abbildung 10	Keine Erniedrigung der miR-181a/miR-181b-Expression in NB4-Zellen nach Behandlung mit Zytostatika.....	55
Abbildung 11	Zytostatika induzieren Apoptose in NB4-Zellen.....	56
Abbildung 12	Zytostatika induzieren keine Differenzierung in NB4-Zellen.	57
Abbildung 13	MiR-181a und miR-181b werden in NB4-Zellen verstärkt exprimiert.....	58
Abbildung 14	PML/RAR α induziert das miR-181a/miR-181b-Cluster.	59
Abbildung 15	In APL-Patienten und in PML/RAR α - <i>knock in</i> -Mäusen wird das miR-181a/miR-181b-Cluster verstärkt exprimiert.	60
Abbildung 16	Stabile Expression von miR-181a- und miR-181b- <i>antisense</i> -Molekülen führt zur Reduktion der miR-181a- und miR-181b-Menge.....	62
Abbildung 17	Stabile Inhibierung von miR-181a und mir-181b induziert Apoptose in NB4-Zellen.	63
Abbildung 18	Verminderte Koloniezahl nach Inhibierung des miR-181a/miR-181b-Clusters.	64
Abbildung 19	Nach stabiler Inhibierung von miR-181a und miR-181b ist die NB4-Koloniegröße reduziert.	65
Abbildung 20	Verminderte Proliferationsfähigkeit der NB4-Zellen nach stabiler Inhibierung von miR-181a und miR-181b.....	66

Abbildung 21	Transiente Überexpression von miR-181a und miR-181b inhibiert die ATRA-abhängige Differenzierung von NB4-Zellen.	67
Abbildung 22	Basenkomplementaritäten zwischen RASSF1A 3'UTR und miR-181-Familie.	69
Abbildung 23	Analyse der RASSF1A-Proteinmenge in verschiedenen AML-Zelllinienmodellen und humanen CD34+ Progenitorzellen.	70
Abbildung 24	Das miR-181a- und miR-181b-Level beeinflusst die RASSF1A-Proteinmenge.	71
Abbildung 25	Luziferasekonstrukte mit originären und mutierten Sequenzen der miR-181-Bindestellen.	72
Abbildung 26	MiR-181a und miR-181b binden direkt an die RASSF1A 3'UTR.	73
Abbildung 27	Verminderte RASSF1A-Proteinmenge in Knochenmarkzellen von APL-Patienten.	74
Abbildung 28	Die RASSF1A mRNA ist in der AML nicht reguliert.	75
Abbildung 29	Erniedrigte RASSF1A-Proteinmengen im Knochenmark von PML/RAR α - <i>knock in</i> -Mäusen.	75
Abbildung 30	Transiente Expression von RASSF1A induziert Apoptose in NB4-Zellen.	76
Abbildung 31	Analyse der RASSF1A-Proteinmenge in NB4-Zellen nach ATRA- und As ₂ O ₃ -Behandlung.	77
Abbildung 32	Verminderte ATRA-abhängige Differenzierung nach stabiler Inhibierung von RASSF1A in NB4-Zellen.	78
Abbildung 33	ATRA und RASSF1A reduzieren die Cyclin D1-Proteinmenge in NB4-Zellen.	79
Abbildung 34	Sh-RNA-vermittelter <i>knock down</i> von RASSF1A inhibiert den ATRA-induzierten Zellzyklusarrest.	80
Abbildung 35	MiR-181a- und miR-181b-vermittelte Induktion von Cyclin D1 in NB4-Zellen ist RASSF1A-abhängig.	81
Abbildung 36	Das miR-181a/miR-181b-Cluster und RASSF1A modulieren Differenzierung und Proliferation von APL-Zellen durch die Regulation von Cyclin D1.	93

Abbildung A 1	Verstärkte Expression des <i>RASSF1</i> -Gens in Zellen des hämatopoetischen Systems.	124
---------------	--	-----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	FAB- Klassifizierung der AML-Subgruppen.....	5
Tabelle 2	Einteilung der AML in prognostische Risikogruppen.	7
Tabelle 3	Auflistung der untersuchten RNA-Proben von APL-Patienten mit molekularen und physiologischen Charakteristika.....	31
Tabelle 4	Auflistung der untersuchten RNA- und Proteinproben von AML-Patienten mit physiologischen und molekularen Charakteristika.....	32

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADAR	<i>adenosine deaminases acting on RNA</i>
Ago2	<i>Argonaut-2, argonate RISC catalytic component 2</i>
AML	akute myeloische Leukämie
AML1/ETO	<i>acute myeloid leukemia 1 protein; runt-related transcription factor 1 (RUNX1)/ Eight-twenty-one</i>
APC	<i>Adenomatous-polyposis-coli</i>
APL	akute Promyelozytenleukämie
Aqua dest.	aqua destillata
Ara-C	Cytarabin; Cytosin-Arabinosid
As ₂ O ₃	Arsentrioxid
ATCC	American Type Culture Collection
ATRA	<i>all-trans retinoic acid</i> ; All-trans-Retinsäure
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
bp	Basenpaare
Bta	<i>Bos taurus</i> ; Hausrind
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C/EBP α ; CEBPA	<i>CCAAT Enhancer binding protein alpha</i>
C/EBP β	<i>CCAAT Enhancer binding protein beta</i>
C/EBP ϵ	<i>CCAAT Enhancer binding protein epsilon</i>
CA-AML	AML mit zygoten genetisch abnormalem Karyotyp
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCD	<i>charge-coupled Device</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Cdc20	<i>cell-division cycle protein 20</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cfa	<i>Canis familiaris</i> , Hund
Chr	Chromosom
CLL	chronische lymphatische Leukämie

CLP	<i>common lymphoid progenitor</i>
CML	chronische myeloische Leukämie
CMP	<i>common myeloid progenitor</i>
CN-AML	AML mit zytogenetisch normalem Karyotyp
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cpo	<i>Cavia porcellus</i> , Meerschwein
C _T	<i>threshold cycle</i>
C-terminal	carboxyterminal
d.h.	das heißt
DAXX	<i>death-domain associated protein</i>
DGCR8	<i>DiGeorge critical region 8</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DNMT3a	<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A</i>
Dno	<i>Dasyus novemcinctus</i> ; Neunbinden-Gürteltier
dNTP	Nukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
Eca	<i>Equus caballus</i> ; Hauspferd
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
Eeu	<i>Erinaceus europaeus</i> , Braunbrustigel
FAB	<i>French-American-British</i>
FACS	<i>fluorescent activated cell sorting</i>
Fca	<i>Felis catus</i> ; Hauskatze
FLT3	<i>fms-related tyrosine kinase 3</i>
FLT3/ITD	<i>fms-related tyrosine kinase 3/ internal tadem duplication</i>
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
G418	Geneticin
GAG	Gruppenspezifisches Antigen
GAPDH	Glycerinaldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GMP	<i>granulocyte-macrophage progenitor</i>

GTPase	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
HAUSP	USP7; <i>ubiquitin specific peptidase 7 (herpes virus-associated)</i>
HDAC	Histon-Deacetylase
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Hsa	<i>Homo sapiens; Mensch</i>
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i>
IDH1	<i>Isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+)</i>
IDH2	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP]</i>
IgG	Immunglobulin G
inv	Inversion
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KIT	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog; c-KIT; CD117</i>
K-ras	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LSK	Lin ⁻ Sca1 ⁺ cKit ⁺
LT-HSC	<i>long term hematopoietic stem cells</i>
m	männlich
MDM2	<i>mouse double minute 2 homolog; E3-Ubiquitin-Proteinligase; Protoonkogen</i>
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MEP	<i>megakaryocytic-erythroid progenitor</i>
microRNA, miR	microRNA
MIR181A1/2HG	<i>MIR181A1/2 host gene</i>
MLL	<i>mixed lineage leukemia</i>
Mml	<i>macaca mulatta; Rhesusaffe</i>
Mmu	<i>mus musculus; Hausmaus</i>
MPP	<i>multipotent progenitor</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MST1/2	macrophage stimulating 1/2

n.s.	nicht signifikant
NK	Negativkontrolle
NPM1	Nucleophosmin (<i>nucleolar phosphoprotein B23, numatrin</i>)
nt	Nukleotide
NuMA	<i>nuclear mitotic apparatus protein 1</i>
O ₂	Sauerstoff
Ocu	<i>Oryctolagus cuniculus</i> ; Wildkanninchen
ORF	<i>open reading frame</i>
p	kurzer Arm des Chromosoms
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert
P/S/G	Penicillin/ Streptomycin/ Glutamin
p120 ^{E4F}	<i>E4F transcription factor 1</i>
p53	<i>tumor protein p53</i>
PACT	<i>protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PLZF	<i>promyelocytic leukemia zink finger protein</i>
PML	<i>promyelocytic leukemia protein</i>
pmol	Pikomol
Ptr	<i>Pan troglodytes</i> ; Schimpanse
Pu.1	Spi-1; <i>spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene</i>
q	langer Arm des Chromosoms
qPCR	quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion
Ran/GTP	<i>Ras-related nuclear protein/ Guanosintriphosphat</i>
RAR α	Retinsäurerezeptor alpha
Ras	<i>Rat sarcoma</i> ; G-Protein Ras
RASSF1A	<i>Ras association (RaIGDS/AF-6) domain family member 1 (RASSF1), transcript variant A]</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure

RNase	Ribonuklease
Rno	<i>Rattus norvegicus</i> ; Wanderratte
rpm	<i>rounds per minute</i>
s	Sekunden
Sar	<i>Sorex araneus</i> ; Waldspitzmaus
SARAH	<i>Sav/Rassf/Hpo</i>
SAV-1	<i>salvador homolog 1</i>
shRNA	<i>short hairpin ribonucleic acid</i>
snoRNA	<i>small nucleolar ribonucleic acid</i>
ST-HSC	short term hematopoietic stem cells
t	Translokation
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tbe	<i>Tupaia belangeri</i> ; Nördliches Spitzhörnchen
TET2	<i>Tet methylcytosine dioxygenase 2</i>
TNF α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
TRBP	TAR RNA-bindendes Protein
U	Units
U	Uracil
U6 /RNU6B	<i>RNA U6 small nuclear 2</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
vsv-g	Glykoprotein G des Vesicular-Stomatitis-Virus
w	weiblich
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Anmerkungen

Im Text verwendete Anglizismen sind kursiv geschrieben.

Gebräuchliche Maßeinheiten und die in der Fachliteratur allgemein üblichen Abkürzungen für Chemikalien sind im Abkürzungsverzeichnis nicht aufgeführt.

1 Einleitung

1.1 Die adulte Hämatopoese

Die adulte Hämatopoese beschreibt die Blutzellentwicklung im Organismus nach der Geburt und unterscheidet sich lokal sowie prozessiv von der im Embryo, welche als embryonale Hämatopoese bezeichnet wird. Das Blutsystem der Mammalia besitzt mehr als 10 verschiedene Blutzelltypen mit diversen Funktionen. Die Leukozyten bilden eine Gruppe spezialisierter Zelltypen, welche in die angeborene unspezifische Immunantwort und die adaptive spezifische Immunantwort involviert ist. Erythrozyten sind für den O_2/CO_2 -Transport zuständig, wohingegen Megakaryozyten die Trombozyten (Blutplättchen) generieren und die Wundheilung und Blutgerinnung steuern. Alle Blutzelltypen werden von hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) gebildet, welche sich hauptsächlich im Knochenmark befinden. Im Laufe des Differenzierungsprozesses werden die sich entwickelnden Blutzellen aus der Stammzellnische des Knochenmarks in das periphere Blutsystem transportiert. In adulten Säugern bilden die HSCs die Spitze einer Hierarchie aus einer Vielzahl von Progenitorzellstadien, welche eine zunehmende Blutlinienrestriktion besitzen. HSCs sind somatische Stammzellen, welche durch Langzeit-*self-renewal* und ein hohes Differenzierungspotential gekennzeichnet sind (LT-HSC). Zu Beginn der Differenzierungskaskade nimmt ihre *self-renewal*-Kapazität ab und sie entwickeln sich zu Kurzzeit-*self-renewal*-HSCs (ST-HSC), aus denen multipotente Progenitorzellen gebildet werden (MPP). MPPs wiederum bilden die Quelle für oligopotente Progenitorzellen, welche ein zunehmend restringiertes Entwicklungspotential besitzen. Hier zweigt sich die hämatopoetische Entwicklungslinie in die gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzellen (CLP) und die gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen (CMP) auf. Aus den CLPs werden über diverse Zwischenstufen die reifen lymphoiden Effektorzellen gebildet, welchen die Fähigkeit zur Bildung myeloid-erythroider Zellen fehlt. Reife lymphoide Zellen bestehen aus B- und T-Zellen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen. Die reifen myeloiden Effektorzellen entstehen über verschiedene Zwischenstufen aus den MLPs und setzen sich aus Megakaryozyten, Erythrozyten, Mastzellen,

Monozyten, Granulozyten und dendritischen Zellen zusammen. MLPs verlieren ebenfalls die Fähigkeit in die lymphoide Linie zu differenzieren (1), (2), (Abb.1).

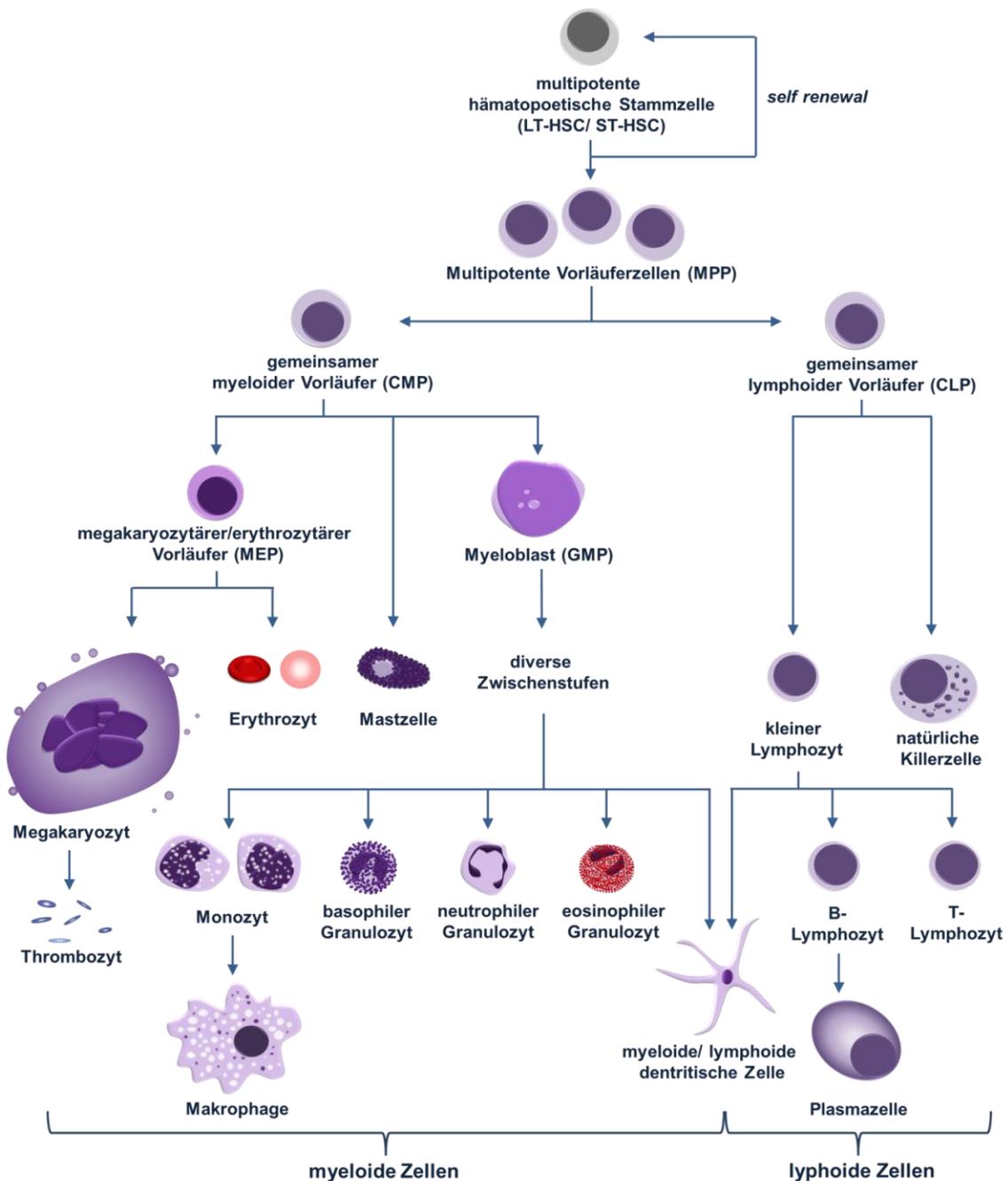


Abbildung 1 Modell der hämatopoetischen Entwicklungshierarchie.

Schematische Darstellung der wichtigsten Entwicklungsstadien der adulten Hämatopoese. Ausgehend von der hämatopoetischen Stammzelle werden über verschiedene Zwischenstufen die reifen Funktionszellen gebildet. LT-HSC (long-term hematopoietic stem cell); ST-HSC (short-term hematopoietic stem cell); CMP (common myeloid precursor); CLP (common lymphoid precursor); MEP (megakaryocytic/erythrocytic precursor); GMP (granulocytic/ monocyctic precursor). Die Abbildung wurde erstellt nach Bryder et al. und Rieger et al. (1), (2).

HSCs sowie die verschiedenen Reifestadien der Blutzellentwicklung sind durch ein für sie charakteristisches Genexpressionsmuster gekennzeichnet (3). So exprimieren die unterschiedlichen Reifungsstufen und die sich entwickelnden Zelllinien charakteristische Zelloberflächenmarker, das sogenannte *cluster of differentiation* (CD). Dabei wird die humane hämatopoetische Stammzelle im Allgemeinen durch die Expression des Oberflächenmarkers CD34 gekennzeichnet (4), (2).

Die Hämatopoese ist ein präzise regulierter Prozess, der durch ein komplexes Netzwerk von extrinsischen und intrinsischen Reizen, Signalwegen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Transkriptionsfaktoren und anderen molekularen Komponenten streng kontrolliert wird (5), (6).

1.2 Leukämie: Deregulation der Hämatopoese

Der Begriff Leukämie, erstmals von Rudolf Virchow 1847 eingeführt, leitet sich vom Griechischen *leuchaimia* für „weis“ und *haima* „das Blut“ ab und bedeutet wortwörtlich übersetzt „weises Blut“. Leukämien, auch als Blutkrebs bezeichnet, gehören als maligne Erkrankungen des blutbildenden oder des lymphatischen Systems zu den Krebserkrankungen.

Bei den Leukämien handelt es sich um eine biologisch und klinisch heterogene Gruppe von malignen Erkrankungen, welche durch die klonale Expansion einer einzelnen Zelle in verschiedenen Entwicklungsstadien der Hämatopoese charakterisiert ist. Dabei geht die Erkrankung in der Regel von einer transformierten Zelle mit uneingeschränkter *self-renewal*-Kapazität aus, deren ungehemmte Teilung zu einer klonalen Expansion gleichartiger Zellen führt (7). Phänotypisch zeigt sich eine unkontrollierte Vermehrung hämatologischer Vorläuferzellen im Knochenmark und in lymphatischen Geweben, wie Lymphknoten und Milz, sowie der Verlust ausgereifter funktionsfähiger Blut- und Immunzellen (6).

Historisch werden Leukämien anhand der Kombination klinischer Kriterien und morphologischer/ immunologischer Eigenschaften eingeteilt. Dies führt zur Unterscheidung der Leukämie in vier Hauptgruppen:

- Akute myeloische Leukämie (AML)
- Chronische myeloische Leukämie (CML)
- Akute lymphatische Leukämie (ALL)
- Chronische lymphatische Leukämie (CLL)

Dabei werden die akuten Leukämien, bei der die Fähigkeit zur Differenzierung verloren geht und die Vorläuferzellen im sogenannten „Blastenstadium“ verbleiben, von den chronischen Leukämien abgegrenzt, bei der die Vorläuferzellen hyperproliferativ sind, jedoch voll ausdifferenzieren können. Dabei sind die akuten Leukämien durch einen schnellen aggressiven Krankheitsverlauf gekennzeichnet, wohingegen sich chronischen Leukämien durch ein weniger aggressives Erscheinungsbild und einen langsamen Verlauf der Erkrankung auszeichnen (7), (8).

1.2.1 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist gekennzeichnet durch die Akkumulation granulozytärer und monozytärer Vorläufer im Knochenmark und zum Teil im peripheralen Blut infolge einer malignen Transformation hämatopoetischer Vorläuferzellen (Leukozytose); (9), (10). Infolge dessen kommt es zu einer Blutarmut (Anämie), vermehrten Infektionen infolge des Mangels an neutrophilen Granulozyten (Neutropenie) sowie einer erhöhten Blutungsneigung durch den Mangel an Thrombozyten (Thrombopenie). Die AML ist der häufigste Leukämietyp bei Erwachsenen und weist die geringsten Überlebensraten aller Leukämien auf. Sie tritt mit einer Inzidenz von 2,7 Fällen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr und steigender Häufigkeit im höheren Lebensalter auf (6), (11).

Traditionelle Klassifizierungssysteme nutzten bisher zellmorphologische Merkmale um verschiedene AML-Subgruppen zu definieren. Dabei werden die einzelnen Subgruppen anhand des Stadiums des leukämischen Blasten, in welchem die normale Hämatopoese unterbrochen ist, charakterisiert. Des Weiteren wurde für die

Diagnostik der AML bei Erwachsenen ein Blastenanteil von $\geq 30\%$ zugrunde gelegt (12). In der resultierenden French-American-British-Klassifizierung (FAB) erfolgte eine Einteilung der AML in 9 Gruppen anhand morphologischer und zytochemischer Merkmale der Blasten sowie anhand von Entitäten mit minimaler myeloischer Differenzierung (Tabelle 1); (13), (14).

Tabelle 1 FAB- Klassifizierung der AML-Subgruppen.

FAB-Subtyp	Bezeichnung	Aberrationen, Entitäten
M0	Akute myeloblastische Leukämie mit minimaler Differenzierung	inv(3q26), t(3;3)
M1	Akute myeloblastische Leukämie ohne Ausreifung	
M2	Akute myeloblastische Leukämie mit Ausreifung	t(8;21), t(6;9)
M3	Akute Promyelozytenleukämie (APL)	t(15;17), t(11;17), t(5;17)
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	11q23, inv(3q26), t(3;3), t(6;9)
M4 _{Eo}	Akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie	inv(16), t(16;16)
M5	Akute Monoblasten-/Monozytenleukämie	11q23, t(8;16)
M6	Erythroleukämie (Erythrämie)	
M7	Akute Megakaryoblastenleukämie	t(1;22)

FAB=Französisch-Amerikanisch-Britisch; inv = Inversion; t = Translokation (10).

Die FAB-Klassifizierung berücksichtigt zwar die morphologischen Unterschiede innerhalb der AML, reflektiert aber nur unzureichend klinische und genetische Varianzen. In über 50% der AML-Patienten werden chromosomale Translokationen wie t(8;21) und t(15;17) und chromosomale Inversionen wie inv(16) nachgewiesen. Diese chromosomalen Veränderungen sind bereits gut als Schlüsselfaktoren für die Entstehung des jeweiligen AML-Subtyps charakterisiert (9). Die Gruppe von AML-Patienten ohne nachweisbare chromosomale Veränderungen wird als zytogenetisch normale AMLs bezeichnet. Bei ihnen sind Mutationen in spezifischen Genen wie *FLT3*, *NPM1*, *CEPBA*, *DNMT3a*, *TET2* und *IDH1/2* von Bedeutung für die

Leukämogenese (15). Neben den genetischen Veränderungen konnten epigenetische Veränderungen wie DNA-Methylierungen und Histon-Modifikationen in der AML nachgewiesen werden (16). Die epigenetischen Veränderungen können durch Mutationen in epigenetisch-modifizierenden Genen (*DNMT3a*, *TET2* und *IDH1/2*) oder durch chimärische Fusionsproteine, die aus chromosomalen Translokationen resultieren, hervorgerufen werden.

Die Klassifizierung der World Health Organization (WHO) misst diesen genetischen Komponenten durch die Korrelation morphologischer, genetischer und klinischer Daten größere Bedeutung bei und führt zu einer Unterteilung in 4 Hauptkategorien (17), (18).

- AML mit zytogenetischen und molekulargenetischen Aberrationen
- AML mit multilineärer Dysplasie
- Therapie-assoziierte AML und MDS
- AML ohne weitere Spezifizierung bzw. Klassifizierung

Nach WHO-Klassifizierung erfolgt eine AML-Diagnose bei einem Anteil pathologischer Myeloblasten an den nukleären Zellen im Knochenmark und/oder Blut von $\geq 20\%$ (18).

Neben der klassischen WHO-Einteilung der AML hat die prognostische Einteilung anhand zytogenetischer Merkmale eine zunehmende Bedeutung für die Risiko-Abschätzung der Behandlung der Patienten (19). Eine günstige Prognose haben hierbei Patienten mit einer Translokation wie $t(8;21)$ und $t(15;17)$ oder einer Inversion $inv[16]$ (20), (21) sowie *CEBPA* Mutationen (22), (23), (24) wohingegen ein hohes Alter [>60] (25), eine sekundäre AML, der Verlust von Chromosom 5 oder 7, die Translokationen $t[6;9]$ (26), $t[9;22]$ (21) sowie ein komplex veränderter Karyotyp (27) mit einer schlechten Prognose assoziiert sind (Tabelle 2).

Tabelle 2 Einteilung der AML in prognostische Risikogruppen.

Risikogruppe	Zytogenetik	Molekulare Charakteristika
günstig	inv(16) oder t(16;16) t(8;21); t(15;17);	normale Zytogenetik mit: Isolierter biallelischer <i>CEBPA</i> -Mutation <i>NPM1</i> -Mutation ohne <i>FLT3</i> -ITD
intermediär	normaler Karyotyp +8 (isoliert) t(9;11) andere nicht-günstig oder nicht-schlecht assoziierten Veränderungen	<i>KIT</i> -Mutation in core binding factor-Leukämien: inv(16) oder t(16;16) t(8;21)
schlecht	komplexer Karyotyp (≥3 klonale Abnormalitäten) monosomaler Karyotyp -5/-5q oder -7/-7q 11q23 <i>rearrangement</i> abweichend von t(9;11) inv(3) oder t(3;3) t(6;9); t(9;22)	normale Zytogenetik mit <i>FLT3</i> -ITD

Die Tabelle wurde erstellt nach Döhner et al. (28).

1.2.2 Akute Promyelozytenleukämie

Eine Ausnahme bei den AML-Erkrankungen bildet die akute Promyelozytenleukämie (APL). Bei der bis in die 1980-iger Jahre unheilbaren Krankheit werden heutzutage durch eine all-trans Retinsäure (ATRA, RA)- und Anthracyclin (Ara-C)-basierende Therapie Langzeitheilungsraten von über 80% erreicht (29), (30), (31), (32). Ihr Auftreten ist altersunabhängig und umfasst ca. 10% aller neudiagnostizierten AML-Erkrankungen (33). Die APL ist charakterisiert durch ein chromosomales *rearrangement*, welches das auf Chromosom 17 (17q21) gelegene Retinsäurerezeptor alpha-Gen (*RARA*) und eines der Gene *PML* (15q22), *PLZF*

(11q23), *NPM* (5q35) und *NuMA* (11q13) betrifft. Dieses *rearrangement* führt zur Bildung eines reziproken Fusionsproteins, welches die ursprünglichen Funktionen der involvierten Genprodukte inhibiert. Die dominant-negative Wirkung des Fusionsprotein ist somit ursächlich für die Ausbildung der APL (34), (35). Bei der Bildung des Fusionsproteins werden die Domänen B bis F des Retinsäurerezeptor alpha-Proteins ($RAR\alpha$), welche für die DNA-Bindung und die Liganden-Bindung verantwortlich sind, C-terminal an den funktionellen Teil von einem der 4 nukleären Partnerproteine fusioniert. (34). Die mit ca. 98% am häufigsten vorkommende Form, ist PML/ $RAR\alpha$ (36), (37), (38), (Abb.2). Hier fusioniert *RARA* mit dem *Promyelocytic Leukemia Protein (PML)*-Gen.

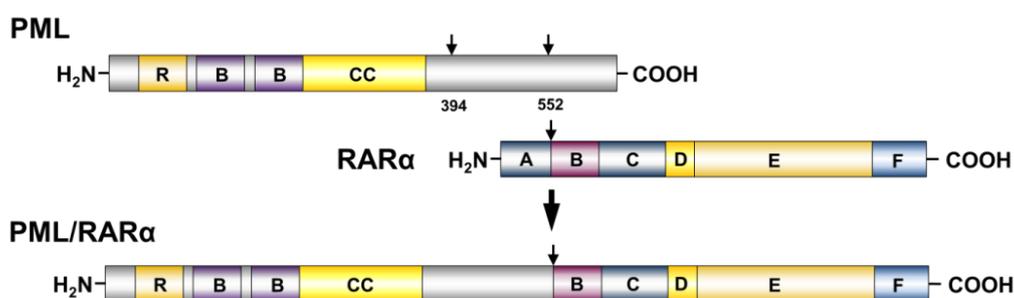


Abbildung 2 Schematische Darstellung der PML/ $RAR\alpha$ -Genese.

Das Fusionsprotein PML/ $RAR\alpha$ resultiert aus der genomischen Translokation des *PML*-Gens an den Genbereich des Retinsäurerezeptors (*RARA*). Die funktionsrelevanten Bereiche sind wie folgt gekennzeichnet: RING (R); B-Boxen (B); *coiled-coiled* Domäne (CC) sind Teil des PML-Proteins. Die $RAR\alpha$ -DNA-Bindedomäne (C) und die Hormon-Bindedomäne (E) sind Teil des $RAR\alpha$ -Proteins. A; B; D und F sind weitere regulatorische Domänen. Das resultierende Fusionsprotein besitzt die funktionellen Domänen von PML und $RAR\alpha$, was ursächlich für die dominant-negative Wirkung gegenüber PML und $RAR\alpha$ ist (35).

PML/ $RAR\alpha$ bildet über die *coiled-coiled*-Domäne des PML Homodimere und bindet über die DNA-Bindedomäne von $RAR\alpha$ an die entsprechenden Bereiche $RAR\alpha$ -responsiver Gene, deren Genprodukte die normale Differenzierung regulieren (39). Durch die PML/ $RAR\alpha$ -vermittelte Rekrutierung von Korepressoren und Histondeacetylasen (HDAC) führt dies zu einer verstärkten DNA-Methylierung (40), (41), (42), (Abb. 3).

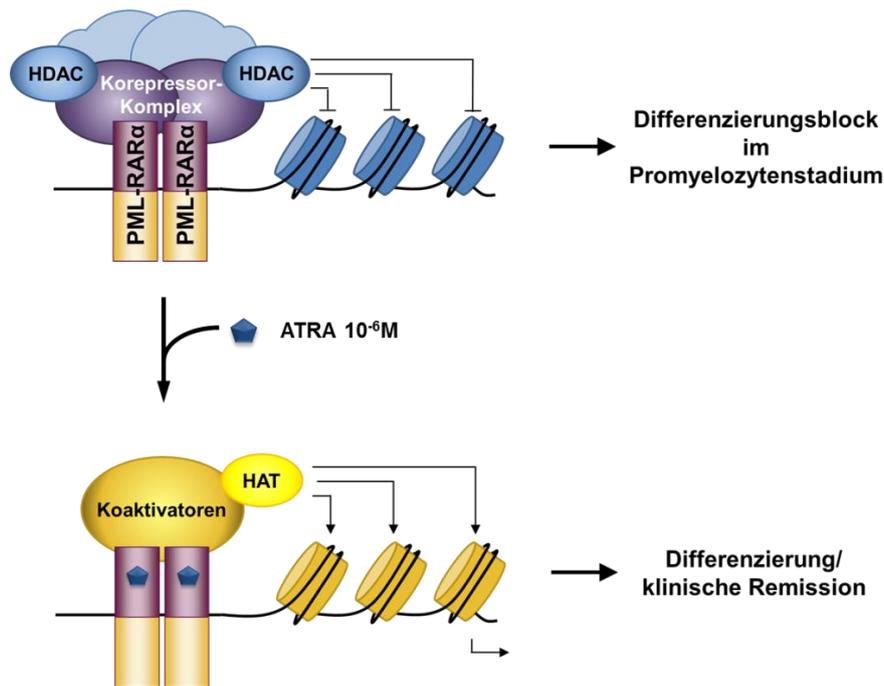


Abbildung 3 Klassisches Modell der APL-Pathogenese.

PML/RAR α bindet und reprimiert RAR α -Zielgene durch die verstärkte Rekrutierung von Korepressoren und HDACs. Die Gabe physiologischer Dosen Retinsäure (10^{-6} M) konvertiert PML/RAR α zu einem Transkriptionsaktivator und führt zur Wiederherstellung der Differenzierung, gefolgt von klinischer Remission. HDAC kennzeichnet Histondeacetylasen und HAT Histonacetyltransferasen (35).

Die transkriptionelle Repression resultiert in die Induktion krebsassoziierter Signalwege (43), (44). Daneben inhibiert PML/RAR α differenzierungsrelevante Proteine wie C/EBP α (45) und PU.1 (46) durch direkte Protein-Proteininteraktion. Durch die Heterodimerisierung vom PML/RAR α und PML kommt es zur Zerstörung der *nuclear bodies*, an dessen Bildung PML grundlegend beteiligt ist (47), (48). Hieraus resultiert die Beeinträchtigung des *p53-signallings*, was zu einer erhöhten Apoptoseresistenz und verändertem *self-renewal* der APL-Progenitoren führt (49), (50), (51), (52). Die Inhibierung des Retinsäure-*signalings* führt somit zum Block der Myelopoese der APL-Blasten.

Die Behandlung der APL mit pharmakologischen Dosen all-trans Retinsäure (ATRA) resultiert in einer schnellen Differenzierung der APL-Zellen in Granulozyten *in vitro* und *in vivo* (53) (54). Dabei wird PML/RAR α in einen transkriptionellen Aktivator konvertiert, was zu einer verstärkten Expression der RAR α -Ziele führt und die normale Differenzierung wieder herstellt (34), (55), (Abb.3). Hier erfolgt die PML/RAR α -abhängige Induktion von C/EBP β (56), C/EBP ϵ (57), PU.1 (58) und die

Revidierung des inhibitorischen Effekts von PML/RAR α auf C/EBP α (45). Es kommt zur RA-abhängigen Induktion von Proteasen und zum Abbau von PML/RAR α (59), (60) sowie zur Wiederherstellung der *nuclear bodies* (61). Der exakte Mechanismus, durch den PML/RAR α die Differenzierung blockt und pharmakologische ATRA-Konzentrationen diesen Block überwinden, ist bisher nur unzureichend geklärt (34). Interessanterweise führt die chemisch nicht verwandte Agens Arsentrioxid auch zur Zerstörung von PML/RAR α (62). Wobei bei Arsentrioxid im Gegensatz zu ATRA der Abbau von PML und PML/RAR α im Vordergrund steht (63) und dabei vorrangig Apoptose und nur partiell zur Differenzierung initiiert wird (64). Klinisch findet Arsentrioxid Einsatz in der Erstbehandlung sowie bei der Therapie ATRA-resistenter APL-Patienten (65). Dabei wird durch die Kombination mit cAMP oder Zytokinen auch die Differenzierung der Blasten induziert (66), (67). Hier kann es wie auch bei der ATRA-Therapie zum Differenzierungssyndrom (*retinoic acid syndrom*) kommen, welches lebensbedrohliche Ausmaße annehmen und den Tod der betroffenen Patienten zur Folge haben kann (68).

1.3 MicroRNAs

MicroRNAs sind kleine, einzelsträngige, nicht-protein-kodierende RNAs mit einer Länge von 20 bis 25 Basen. Sie spielen eine wichtige Rolle im komplexen Netzwerk der Genregulation. Hier führen sie posttranskriptionell zum Stilllegen (*silencing*) spezifischer Gene und sind somit ein wichtiger Faktor der Epigenetik (69), (70). Erstmals beschrieben wurden microRNAs im Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) als *lin-4* und *let-7* (71), (72). Der hier entdeckte Mechanismus ist in alle höheren Spezies zu finden und evolutionär hochkonserviert (73).

Seit ihrer Entdeckung haben Anzahl und Bedeutung der microRNAs stetig zugenommen. Innerhalb des menschlichen Genoms werden ca. 20 – 30% aller proteinkodierenden Gene direkt durch microRNAs reguliert (74), (75). Zurzeit werden in der miRBase Sequence Datenbank 2588 reife humane microRNAs (miRBase Release 21; mirbase.org) gelistet. MicroRNAs werden ubiquitär exprimiert. Ihre Expressionsmuster variieren in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium und vom Gewebs- und Zelltyp (76). Sie beeinflussen zahlreiche biologische Prozesse wie

Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und Organbildung (77), (78). Forschungen der letzten Jahre konnten einen Zusammenhang zwischen abnormal veränderten microRNA-Expressionsmustern und der Deregulation zellulärer Prozesse aufzeigen, und somit den microRNAs eine immer größer werdende Bedeutung, u. a. bei der Entstehung von Krebs, zuweisen (79), (80), (81), (82).

1.3.1 Biogenese und Funktion

MicroRNAs sind innerhalb von Exons oder Introns proteinkodierender Gene, bzw. in nichtkodierenden DNA-Regionen lokalisiert. Einige microRNAs besitzen eigene Promotoren und können in einem genomischen Cluster, welches eine transkriptionelle Einheit bilden kann, organisiert vorliegen (83), (84). Die Transkription der microRNA-Gene in primäre microRNA-Transkripte (pri-microRNA) erfolgt durch RNA-Polymerase II und RNA-Polymerase III (85), (86). Dabei sind Polymerase II-generierte pri-microRNAs polyadenyliert und *capped* (87). Die Transkription von microRNA-Genen unterliegt den herkömmlichen Kontrollmechanismen wie Transkriptionsfaktoren (88) und Methylierung (89). Durch *editing* der pri-microRNAs, d. h. den Austausch von Adenosin in Inosin durch ADAR-Enzyme, kann die anschließende Prozessierung durch das Enzym Drosha verstärkt sowie die Zielerkennung und die Struktur verändert werden (90), (91). Im Allgemeinen besitzt eine pri-microRNA einen 33 Basenpaar langen doppelsträngigen *hairpin stem loop* und zwei einzelsträngige den *hairpin* flankierende Regionen. Die endonukleolytische Spaltung der pri-microRNA wird durch den Mikroprozessorkomplex Drosha-DGCR8, welcher aus dem RNase III Enzym Drosha und dem DGCR8 (DiGeorge critical region 8)-Protein (Pasha) gebildet wird, vermittelt (92), (93). Dabei spalten die zwei RNase-Domänen von Drosha den 5'- und den 3'-Arm des pri-microRNA *hairpin* (94). DGCR8 interagiert direkt mit der RNA und bestimmt die genaue Schnittstelle für die Spaltung (95). Der Kernexport der entstandenen pre-microRNA erfolgt durch den Exportin-5-Ran-GTP-Komplex (96). Im Zytoplasma wird die Reifung der microRNA durch den RISC *loading complex* vermittelt. Dieser besteht aus der RNase III Dicer, dem doppelsträngigen RNA-Bindeprotein TRBP (*TAR RNA binding protein*) und PACT (*protein activator of PKR*), die sich mit Argonaut-2 (Ago2) vereinigen (97), (98). TRBP stabilisiert Dicer und zusammen mit PACT begünstigt es die Dicer-vermittelte

Spaltung der pre-microRNA. Zudem rekrutieren TRBP und PACT Ago2 (99), (100). Bei pre-microRNAs mit einer hohen Komplementarität im *hairpin*-Stamm wird durch die *slicer*-Aktivität von Ago2 der 3'-Arm des hairpins abgespalten (101). Dieser Schritt begünstigt die Strang-Dissoziation und die RISC-Aktivierung (102). Anschließend erfolgt die *loop*-Abspaltung durch Dicer. Hieraus resultiert ein ca. 22 Nukleotide langer microRNA-Duplex mit einem 2 Nukleotide langem Überhang an jedem 3'-Ende (103). Gefolgt wird dies vom Aufwinden des RNA-Doppelstrangs unter Mitwirkung diverser Helikasen (104). Danach wird der Strang mit dem weniger stabilen Basenpaar am 5'-Ende des Duplex in den RISC-Komplex inseriert, der andere Strang wird degradiert (105), (106). Im RISC-Komplex erfolgt die ortsspezifische Spaltung und der Abbau der mRNA sowie die Repression ihrer Translation (107), (108), (109), (Abb.4).

Reife microRNAs besitzen eine 5' Phosphat- und eine 3' Hydroxylgruppe. Die Bindung einer microRNA an potentielle proteinkodierende Ziel-mRNAs wird durch Komplementarität einer kurzen aus 2-8 Nukleotiden bestehenden Sequenz in der 3'UTR der Ziel-mRNA (microRNA-„seed“) vermittelt (110). Kommt es zu einer kompletten Komplementarität wird die Ziel-mRNA gespalten und abgebaut, wohingegen eine unperfekte Basenpaarung vorrangig zur Repression der Translation führt (107). Da die Komplementarität der Sequenzen von microRNAs und ihren mRNA-Zielen auf nur wenige Nukleotide beschränkt ist, kann jede microRNA mit einer Vielzahl von mRNAs interagieren und eine einzelne mRNA viele microRNA-Erkennungsstellen innerhalb der 3'UTR beherbergen (111). Die besondere Bedeutung des microRNA-abhängigen Regulationsmechanismus konnte anhand eines murinen *Dicer-knock outs*, bei dem es zur Letalität durch Verlust der Stammzellen kommt, gezeigt werden (112).

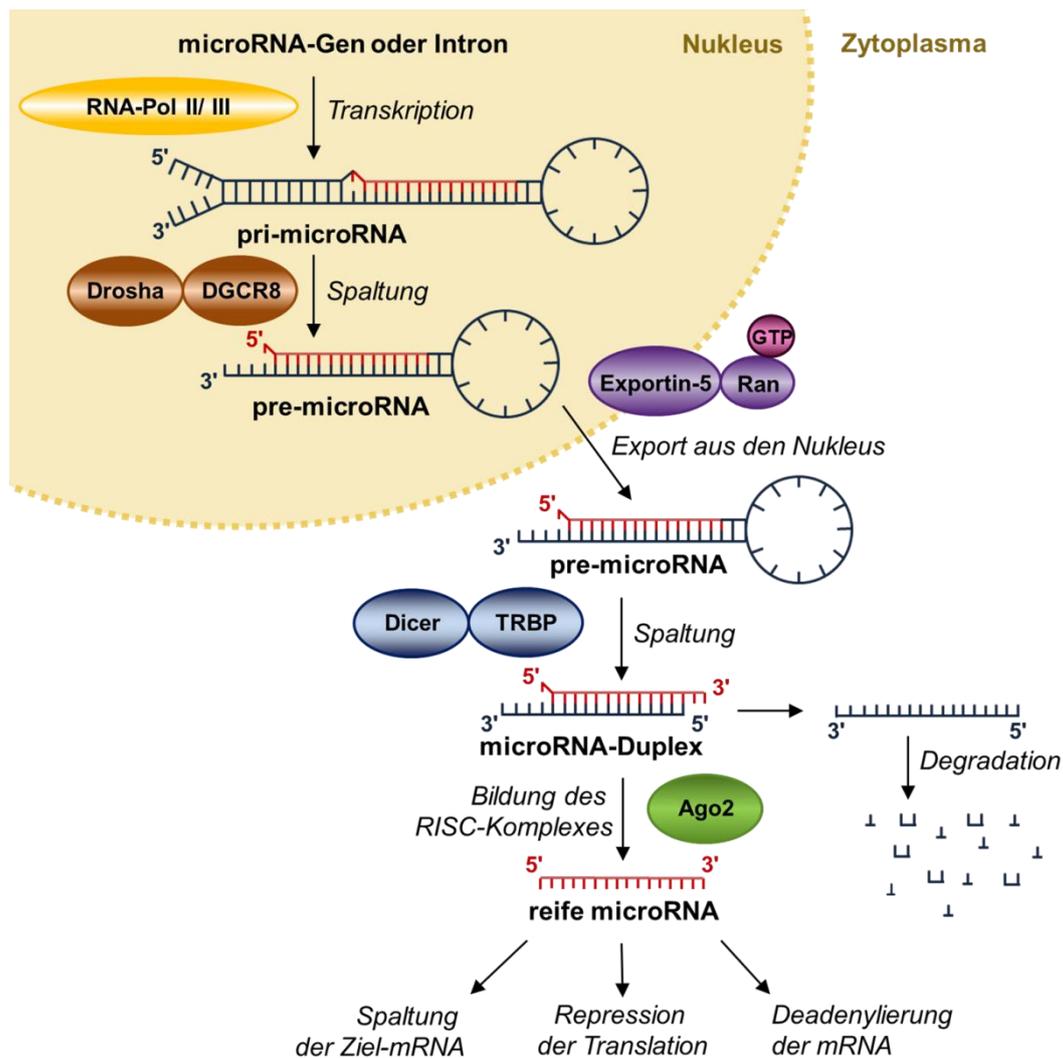


Abbildung 4 Schematische Darstellung der microRNA-Prozessierung.

Das primäre microRNA-Transkript (pri-microRNA) wird durch RNA-Polymerase II und III von der DNA abgelesen und durch den Mikro-Prozessorkomplex Drosha-DGCR8 (Pasha) zum „precursor hairpin“ (pre-microRNA) gespalten. Der Export aus dem Nucleus erfolgt über den Exportin 5-Ran-GTP-Komplex. Im Zytoplasma spaltet die RNase Dicer, welche sich in einem Komplex mit TRBP (doppelsträngige RNA-Bindeprotein) befindet, die pre-microRNA zu ihrer reifen Länge. Der funktionelle microRNA-Stang (rot) wird gemeinsam mit dem Argonaut-Protein (Ago2) in den „RNA-induced silencing“-Komplex (RISC) geladen. Hier kommt es zur spezifischen microRNA-abhängigen Spaltung, translationellen Repression oder Deadenylierung der mRNA. Der microRNA-Gegenstrang (schwarz) wird abgebaut. Es handelt sich hier um ein linear vereinfachtes Modell der Biogenese. Die Abbildung wurde erstellt nach Winter et al. (113).

1.3.2 MicroRNAs in der Hämatopoese

Die systematische Analyse von microRNA-Expressionsmustern und microRNA-Funktionen während der Hämatopoese konnte eine Vielzahl komplexer regulatorischer Netzwerke identifizieren, in denen microRNAs als Feinregulatoren der hämatopoetischen Differenzierung und der Effektorzellfunktionen wirken (114). So konnte erstmals durch Chen et al. gezeigt werden, dass einige microRNAs, wie z. B. miR-181, miR-223 und miR-142, spezifisch in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden und eine entscheidende Rolle in der hämatopoetischen Entwicklung spielen (115). Des Weiteren konnte dem miR-17-92-Cluster eine essentielle Rolle in der B-Zell-Entwicklung (116) sowie miR-150 und miR-155 in der B- und T-Zell-Funktion zugewiesen werden (117), (118). Ferner werden miR-10a und miR-130 während der Megakaryozytenentwicklung und miR-221 und miR-222 während der Erythropoese reprimiert (119), (120). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Expression von miR-125b zu einem Block in der G-CSF-induzierten Granulopoese führt (121) und miR-125a die hämatopoetische Stammzellpopulation durch Kontrolle der Apoptose reguliert (122). Einer Vielzahl weiterer microRNAs konnten in den letzten Jahren Funktionen in der hämatopoetischen Entwicklung zugewiesen werden. Dabei vervollständigt die Identifikation neuer microRNAs und derer Ziele sowie der zugrundeliegenden transkriptionellen Regulationsmechanismen das komplexe Bild der Hämatopoese.

1.3.3 MicroRNAs in der Leukämie

Genomweite Expressionsanalysen konnten eine Vielzahl von microRNAs identifizieren, welche in malignen hämatopoetischen Geweben dereguliert vorliegen (123), (124), (125). Dabei sind die maßgeblich zugrunde liegenden Ursachen für ein abnormales microRNA-Expressionsmuster genetische Veränderungen, epigenetische Mechanismen, Deregulation der Transkription, Mutationen im microRNA-Biogenese-Signalweg und Mechanismen, die die microRNA-vermittelte Repression umgehen (126), (127), (128) Erstmalig wurde eine Relevanz von microRNAs in hämatopoetischen Erkrankungen am Beispiel der Deletion von miR-15 und miR-16 in der CLL beschrieben (129). In der AML konnten die Arbeiten

verschiedener Gruppen eine Assoziation zwischen microRNA-Signaturen und den spezifischen AML-Subtypen herstellen (123), (130), (131), (132). Darauf aufbauend konnten bereits verschiedene für Diagnostik und Prognose relevante microRNAs identifiziert werden. So ist miR-212 mit einem verlängertem Überleben assoziiert (133) und miR-155 in AML-Patienten mit einer FLT3/ITD-Mutation, welche mit einer schlechten Prognose verbunden ist, erhöht exprimiert (134). Bisher konnten nur wenige Studien die Funktion von microRNAs bei der Pathogenese der AML beschreiben. Dabei zeigt sich, dass microRNAs in Abhängigkeit von der Ziel-RNA sowohl als Tumorsuppressoren als auch als Onkogene fungieren können (135). So konnten miR-125b (136), miR-146a (137), miR-155 (138) onkogene Eigenschaften bei der Entstehung der AML zugewiesen werden, wohingegen miR-29b (139), miR-223 (140) und miR-342 (141) tumorsuppressiv wirken. In der APL konnte gezeigt werden, dass das onkogene Fusionsprotein PML/RAR α neben mRNA-Genen auch microRNA-Gene transkriptionell reprimiert und dadurch die Induktion wichtiger Krebs-assoziiierter Proteine hervorruft (43). Einige dieser microRNAs werden nach Behandlung mit ATRA und dem daraus resultierenden Verlust des onkogenen Fusionsproteins reexprimiert (43), (125). So konnte für miR-223 (142) und let-7c (143) eine Involvierung in die ATRA-basierende Granulozytendifferenzierung bereits gezeigt werden. Daneben konnte auch die Repression von microRNAs nach ATRA-Behandlung beobachtet werden (125). Einigen dieser microRNAs, wie miR-125b (144) und miR-146a (145), konnten bereits onkogene Eigenschaften im Kontext der APL zugewiesen werden. Dabei ist der Mechanismus der PML/RAR α -vermittelten microRNA-Induktion bisher ungeklärt.

1.3.4 Die miR-181-Genfamilie

Die miR-181-Familie gehört zu den microRNAs, welche erstmals als verstärkt in hämatopoetischen Geweben exprimiert, nachgewiesen werden konnten (115). Sie umfasst miR-181a, miR-181b, miR-181c und miR-181d. Im Menschen sind miR-181a und miR-181b in jeweils einem genomischen Cluster auf Chromosom 1 (miR-181a-1 und miR-181b-1) und Chromosom 9 (miR-181a-2 und miR-181b-2) organisiert (Abb. 5). Das Cluster miR-181a-1/miR-181b-1 befindet sich auf dem *antisense*-Strang im Intron 2 des Gens *MIR181A1HG* (Hostgen). Die beiden microRNA-Gene werden

dabei lediglich durch 62 Basenpaare getrennt. Das Cluster miR-181a-2/miR-181b-2 ist auf dem *sense*-Strang im Intron 1 des Hostgens *MIR181A2HG* lokalisiert. Hier sind die beiden microRNA-Gene durch 1159 Basenpaare getrennt. Beide miR-181a/miR-181b-Hostgene sind nicht proteinkodierend. MiR-181c und miR-181d sind ebenfalls in einem genomischen Cluster auf Chromosom 19 organisiert (146), (147). Die Sekundärstruktur und die *seed*-Sequenz der miR-181-Familie ist innerhalb der Vertebraten evolutionär konserviert (148).

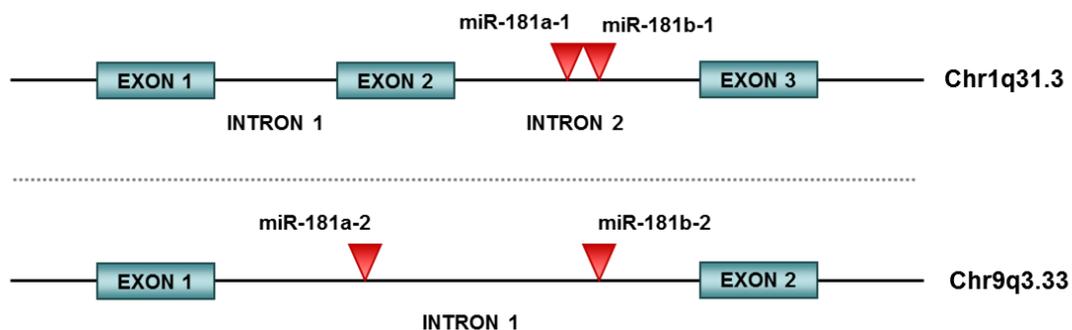


Abbildung 5 Genomische Organisation des miR-181a/miR-181b-Clusters.

MiR-181a und miR-181b bilden ein genomischen Cluster, welches beim Menschen auf Chromosom 1 (Chr1q31.3; miR-181a-1 und miR-181b-1) und Chromosom 9 (Chr9q3.33; miR-181a-2 und miR-181b-2) lokalisiert ist.

Die Mitglieder der miR-181-Familie werden während der Differenzierung in unterschiedlichen Geweben exprimiert. So sind alle miR-181-Mitglieder in die embryonale Stammzellentwicklung (149), (150), (151) sowie T-Zellentwicklung und -funktion (152), (153), (154), (155), (156) involviert. Des Weiteren konnte die funktionelle Relevanz der miR-181-Mitglieder bei der Muskelzellentwicklung und -funktion (157), (158) in Leberzellen (159), (160), in der Osteoblastenentwicklung (161), in Astrozyten (162), in Pankreaszellen (163), in der Chondrozytendifferenzierung (164) sowie bei der Inflammation (165), (166) gezeigt werden. Eine besondere Bedeutung scheint die miR-181-Familie während der Hämatopoese zu haben (167), (115), (168). Insbesondere für das miR-181a/miR-181b-Cluster konnte eine Funktion während Erythropoese (169), Monozyten- und Granulozytenentwicklung (170), (171), Megakaryopoese (172) und Lymphozytenreifung, (153), (156), (173), (174) gezeigt werden.

Daneben beschreibt eine Vielzahl von Studien veränderte miR-181-Expressionen in malignen Geweben und die Involvierung in die Krebsentstehung. Dabei können die miR-181-Mitglieder in Abhängigkeit vom Gewebe und der Ziel-mRNA sowohl als Tumorsuppressoren als auch als Onkogene fungieren. So wirken im Gliom, einer malignen Erkrankung des Gehirns, alle miR-181-Mitglieder tumorsuppressiv (175), (176), (177), (178). Des Weiteren wurde eine veränderte Expression einer oder mehrerer miR-181-Mitglieder im Leberzellkarzinom (179), (180), im oralen Plattenepithelkarzinom (181), im Kolorektalkarzinom (182), im Darmkrebs (166), im Brustkrebs (183), (184), im Magenkarzinom (185), (186), (187), im Prostatakrebs (188), (189), im Lungenkrebs (190), (191), im Pankreaskrebs (192), (193), (194) und im Gebärmutterhalskrebs (195), (196) nachgewiesen.

Während miR-181c und miR-181d bisher vorwiegend in soliden Tumoren beschrieben wurden, konnte das miR-181a/miR-181b-Cluster insbesondere im Zusammenhang mit Bluterkrankungen nachgewiesen werden. So sind beide microRNAs im multiplen Myelom, im myelodysplastischem Syndrom und daraus resultierender AML erhöht exprimiert (197), (198). Eine onkogene Funktion des microRNA-Clusters konnte im Non-Hodgkin-Lymphom nachgewiesen werden (199).

Fei et al. zeigten, dass die miR-181a-Expression in der CML reduziert ist. Eine erhöhte miR-181a-Menge führt in diesen Zellen zur Apoptose und vermindertem Zellwachstum (200). Auch in der CLL besitzt das miR-181a/miR-181b-Cluster tumorsuppressive Funktionen (201), (202). In der AML werden miR-181a und miR-181b mit onkogenen sowie tumorsuppressiven Eigenschaften assoziiert. Debernardi et al. und Isken et al. zeigten, dass die miR-181a-Expression in den AML-Subtypen M1 und M2 im Vergleich zu der in M4 und M5 erhöht ist (203), (204). Eine erhöhte Expression aller miR-181-Mitglieder ist ebenso charakteristisch für AML-Patienten mit normalen Karyotypen (CN-AML), welche eine *CEBPA*-Mutation tragen (205). Hickey et al. konnten in diesem Zusammenhang nachweisen, dass die erhöhte miR-181a-Expression durch die Bindung der mutierten C/EBP α -Isoform p30 an den miR-181a-Promotor hervorgerufen wird (206). Erniedrigte miR-181a-Expressionswerte konnten in einer Hoch-Risiko-Gruppe von CN-AML-Patienten, welche das NPM1-Wildtyp-Gen und/ oder eine FLT3/ITD-Mutation tragen, beobachtet werden (207). In Patienten mit den zytogenetisch abnormalen AML-Formen (CA-AML) t(8;21), t(15;17) und inv(16) wurden erhöhte miR-181-Expressionswerte gemessen (132).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten miR-181a- und miR-181b-Expression und einer günstigen Prognose für die Therapie der AML Patienten zeigen (205), (208), (209). Dem entsprechend ist eine erniedrigte miR-181-Expression nachweislich mit einer schlechten Prognose assoziiert (130). Des Weiteren verbessert eine erhöhte Expression der miR-181a (206) bzw. miR-181b (210) das Ansprechen auf die konventionelle Zytostatika-basierende AML-Therapie. Zudem konnte gezeigt werden, dass miR-181a Apoptose in Ara-C-resistenten AML-Zellen induziert (211). Im Gegensatz dazu wird in APL-Zellen die Expression von miR-181a und miR-181b durch die Behandlung mit ATRA reduziert (125), (43). In diesem Zusammenhang konnten Careccia et al. zeigen, dass in APL-Blasten mit der Translokation t(15;17) die miR-181b-Expression im Vergleich zu gesunden Promyelozyten erhöht ist (212). Diese Daten konnten durch Su et al. für alle miR-181-Mitglieder bestätigt werden (170). Im Einklang damit, inhibiert die Expression der miR-181a in AML-Zellen und in CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen die myeloide Differenzierung (170), (213). Zusammenfassend deuten diese Studien auf das miR-181a/miR-181b-Cluster als ein mögliches Ziel der modernen AML-Therapie (214).

1.4 Der Tumorsuppressor RASSF1A

RASSF1A [*Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1 (RASSF1), transcript variant A*] ist eines von 8 Transkripten (A-H) des *RASSF1*-Gens, welche in der im Lungenkrebs als genetisch instabil identifizierten Region Chr.3p21.3 lokalisiert ist. Erstmals kloniert und beschrieben wurde das Gen in einer Arbeit von Dammann et al. (215). Die verschiedenen Transkriptvarianten werden durch alternatives *splicing* bzw. durch Nutzung unterschiedlicher Promotoren generiert. Dabei sind RASSF1A und RASSF1C die am besten untersuchten Varianten. Beide sind an den Mikrotubulis lokalisiert und in die Regulation von Zellwachstum und Zellmigration involviert (216), (217). Während RASSF1C die Proliferation von Krebszellen, insbesondere Lungen- und Brustkrebszellen, fördert (218), (219), (220), ist RASSF1A ein gut untersuchter Tumorsuppressor (221), (222).

In einer Vielzahl solider Tumore konnte die transkriptionelle Inaktivierung des RASSF1A-Gens durch eine veränderte Promotormethylierung nachgewiesen werden (223), (215), (224). So wurde in Lungenkrebs (225), Brustkrebs (226), Blasenkrebs (227) und Gebärmutterhalskrebs (228) die Hypermethylierung des *RASSF1A*-Promotors mit einer hohen Frequenz beschrieben. Daneben können auch vereinzelt Punktmutationen des *RASSF1A*-Gens auftreten und zur Inaktivierung des Proteins führen (229). Auch die posttranskriptionelle Inaktivierung durch microRNAs wurde bereits beschrieben. So konnten Meng et al. die miR-181a-vermittelte Repression von RASSF1A im Leberkrebs zeigen (230). Interessanterweise, liegt in der AML der RASSF1A-Promotor unmethyliert vor (231), (232), (233) und die RASSF1A-mRNA-Expression ist im Vergleich zu gesunden Proben unverändert (234). Bisher wurden noch keine Studien zu einer möglichen Involvierung von RASSF1A in die AML-Pathogenese veröffentlicht. Ein direkter Zusammenhang zwischen Verlust von RASSF1A und der Entstehung von Krebs konnte durch die Reexpression von RASSF1A in RASSF1A-negativen Krebszellen gezeigt werden. Hier kommt es zur verminderten Koloniebildung *in vitro* und zum reduzierten Tumorwachstum im Mausmodell (223), (215), (235), (236). In RASSF1A-*knock out*-Mäusen konnte die Entwicklung spontaner Tumore, vor allem in Brust, Lunge, Gastrointestinaltrakt sowie im Immunsystem beobachtet werden (237), (238).

Die RASSF-Familie, welche insgesamt 10 Mitglieder mit verschiedenen *splice*-Varianten umfasst, ist durch die ihnen gemeinsame *Ras association* (RA)-Domäne charakterisiert. Über diese Domäne wird die Interaktion mit Ras GTPase-Proteinen wie Ras und K-Ras zur Weiterleitung pro-apoptotischer Signale vermittelt (222), (239). Des Weiteren besitzt RASSF1A eine SARAH-Domäne, über welche RASSF1A mit *downstream* gelegenen Kinasen, wie MST1/ MST2 und dem Tumorsuppressor SAV1, interagiert und ebenfalls apoptotische Signale weiterleitet (240). Durch die Kinasen-vermittelte Phosphorylierung des Proteins ist RASSF1A in verschiedene zelluläre Prozesse wie DNA-*damage response* (241), Zellzyklusregulation (242), Apoptose (243) und mitotischen Arrest (244) involviert. Demzufolge resultiert die Überexpression von RASSF1A in Krebszelllinien in Apoptose, Zellzyklusarrest und einer reduzierten Tumorigenität (245). Der RASSF1A-*knock down* wiederum verursacht den Verlust der Zellzykluskontrolle (246), eine verstärkte genetische

Instabilität (247), erhöhte Beweglichkeit der Zellen (217) und die Resistenz gegenüber K-Ras- und TNF α -induzierter Apoptose (248), (249).

In der Zelle ist RASSF1A an den Zentrosomen und dem mitotischen Spindelapparat lokalisiert und besitzt die Fähigkeit zur Modulation der Tubulin-Dynamik. Dadurch ist RASSF1A in die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität und in die Regulation von Zellwachstum und Migration involviert (216), (217), (246), (247), (250), (251). RASSF1A inhibiert den Übergang von der G1- zur S-Phase durch die Repression von Cyclin D1 (252), (253) und Cyclin A2 (254), (255). Des Weiteren induziert RASSF1A den Zellzyklusarrest in der M-Phase durch Block der Cdc20-abhängigen Aktivierung des Anaphase-*promoting*-Komplexes (APC), was zum Abbau von Cyclin A und B führt und somit zum Austritt aus der Mitose (246), (251). Ferner kontrolliert RASSF1A den Zellzyklus und die Apoptose durch die Stabilisierung von p53 (256). Somit reguliert RASSF1A multiple biologische Prozesse als *scaffolding*-Protein, das diverse Effektorproteinkomplexe zusammenfügt und moduliert (231).

1.5 Motivation der Arbeit

Die akute Promyelozytenleukämie hat sich in den letzten Jahrzehnten durch den therapeutischen Einsatz des Vitamin A-Säure-Derivats all-trans Retinsäure (ATRA) von einer hochgradig tödlichen zu einer malignen Erkrankung mit sehr guten Heilungsraten entwickelt. Trotz der guten Heilungschancen gibt es noch immer Patienten, die an den Folgen der Krankheit aufgrund des Versagens konventioneller Therapieformen bzw. infolge der physiologischen Belastung durch die Behandlung versterben.

Das Ziel dieser Arbeit war es einen tieferen Einblick in die Pathogenese der APL zu erlangen und dabei zur Aufklärung der Mechanismen der Krankheitsentstehung beizutragen. Diverse Publikationen konnten bereits den Mechanismus der microRNA-vermittelten posttranskriptionellen Expressionsregulation von Genen in die Entstehung der APL involvieren. Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass das in der Hämatopoese relevante miR-181a/miR-181b-Cluster in der APL verstärkt exprimiert wird. Jedoch konnte bisher kein Nachweis einer spezifischen Funktion des microRNA-Clusters in der PML/RAR α -assoziierten APL erbracht werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte somit die spezifische Rolle des miR-181a/miR-181b-Clusters in der APL untersucht werden. Durch die Analyse der microRNA-Expressionen in verschiedenen APL-Modellen und in Patientenproben, die funktionelle Untersuchung des microRNA-Clusters sowie die Identifikation und Charakterisierung eines putativen Ziels sollte dem miR-181a/miR-181b-Cluster eine definierte Funktion in der APL-Pathogenese zugewiesen werden.

Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse sollen zur Entwicklung neuer innovativer Therapieformen beitragen, und somit zur Verbesserung der Heilungsraten und zur Minimierung der Therapie-assoziierten physiologischen Belastungen der Patienten führen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Geräte

Autoklav Model 5050 EVL

Bakterieninkubator

Brutschrank, Heracell 150i

Durchflusszytometer BD FACS LSR II

Durchflusszytometer BD FACS Aria™ III
(Cell sorter)

Elektrophoresesysteme:

Horizontal: Sub-Cell Model 192 Cell

Vertikal: Mini Transblot®Cell

Elektroporationsgerät: Nucleofector® 2b Device

Feinwaage AX4202

GFL® Schüttelinkubator 3031

Hettich Zentrifuge universal 16

Kühlzentrifuge Heraeus Fresco 17

Lichtmikroskop Axio Vert. A1

Luminometer Lumat LB9705

Milli-Q-Anlage

Nano-Photometer™

Pipetten 10, 20, 100, 200, 1000

Pipettierhilfe

Real Time PCR System 7500

Real Time Thermal Cycler (Rotor-Gene™ 3000)

Schüttler Rotamax 120

Sterilbank Modell HeraSafe Heraeus

Hersteller/ Vertrieb

Tuttnauer

Memmert GmbH

Thermo Scientific

BD Biosciences

BD Biosciences

Bio-Rad Laboratories Inc.

Bio-Rad Laboratories Inc.

LONZA

Sartorius

GFL

Hettich Labtechnology

Thermo Scientific

Carl Zeiss

Berthold Technologies

Millipore

Implen

Rainin; Eppendorf

Integra Bioscience

Applied Biosystems

Corbett Research Australia

Heidolph

Thermo Scientific

Stromversorgungsgerät:

Power Pac 1000	Bio-Rad Laboratories Inc.
Thermal Cycler T100™	Bio-Rad Laboratories Inc.
ThermoCycler (T Gradient Thermoblock)	Biometra®
Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories Inc.
Vortexer	Fisher Scientific
Wasserbad	GFL

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien, soweit im Text nicht anders erwähnt, wurden von den Firmen TPP, TH Geyer, Greiner bio-one, Eppendorf, StarLab, Carl Roth, alphalaboratories, Hettich, Thermo Scientific und GE healthcare bezogen.

2.1.3 Software

CellQuest™	BD Biosciences
Cylogic 1.2.1	CyFlo Ltd
Image J	National Institutes of Health
SPSS17	IBM

2.1.4 Reagenzien

Chemikalien

Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30)
 Agar-Agar
 Ampicillin
 APS (Ammoniumperoxodisulfat)
 Bromphenolblau
 BSA (Bovine serum albumin) purified
 dNTP-Mix

Hersteller/ Vertrieb

Carl Roth GmbH
 Carl Roth GmbH
 Sigma-Aldrich
 Carl Roth GmbH
 Carl Roth GmbH
 SERVA Electrophoresis GmbH
 QIAGEN

DTT (Dithiothreitol)	Sigma Aldrich
Ethanol	Carl Roth GmbH
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH
GelRED™	Biotium
Giemsa	Sigma-Aldrich
Glycerol	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH
Isopropanol	Carl Roth GmbH
May-Grünwald-Lösung	Sigma-Aldrich
Methanol	Carl Roth GmbH
Milchpulver	Carl Roth GmbH
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth GmbH
PBS (Phosphate buffered saline)	Sigma-Aldrich
PEG-it™ Virus Precipitation Solution	System Bioscience
PEI (Polyethylenimin)	Sigma Aldrich
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Fluka
Ponceau S	Sigma-Aldrich
PI (Propidiumiodid)	Sigma-Aldrich
Protein Assay Dye Reagent	Bio-Rad Laboratories Inc.
Proteinase Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich
RiboLock-RNase-Inhibitor	Thermo Scientific
RNase/DNase-freies Wasser	Qiagen, Thermo Scientific
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH
Temed (Tetramethylethyldiamin)	Bio-Rad Laboratories GmbH
Tris-HCl	Carl Roth GmbH
TRizol®	Invitrogen
Trypanblau	Carl Roth GmbH
Tween®20	Carl Roth GmbH
WesternSure Chemiluminescence Substrat	Li-COR Bioscience
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

Zellkulturmedien und Zusätze

All-trans Retinsäure (ATRA)
 Ara-C (Cytarabin)
 Arsen-Trioxid (As₂O₃)
 Blastocidin
 DMEM (*high glucose*)
 DMEM (*low glucose*)
 DMSO (Dimethylsulfoxid)
 Doxorubicin
 FBS (Fötale Kälberserum)
 G418 (Geneticin)
 MethoCult™ H4230
 Opti-MEM
 Penicillin/Streptomycin/Glutamin (P/S/G)
 Puromycin
 RPMI 1640 (+/- Phenolrot)

Kommerzielle Kits

AMAXA™ Cell line Nucleofector® Kit V
 Bio-Rad Protein Assay
 CD34 microBead Kit, human
 Dual Luciferase™ Reporter Assay Kit
 HiSpeed® Plasmid Maxi Kit
 PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I
 QIAprep® Spin Miniprep Kit
 QuantiTect® SYBR Green PCR Kit
 QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit
 Revert Aid™ H Minus First Strand cDNA
 Synthesis Kit
 TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit
 TOPO® TA cloning Kit for subcloning

Hersteller/ Vertrieb

Sigma-Aldrich
 Sigma-Aldrich
 Sigma-Aldrich
 Sigma-Aldrich
 PAA Laboratories GmbH
 PAA Laboratories GmbH
 Sigma-Aldrich
 Seleckchem
 PAA Laboratories GmbH
 Sigma-Aldrich
 StemCell Technologies
 Thermo Scientific
 Gibco®
 MP Biomedicals
 PAA Laboratories GmbH

Hersteller/ Vertrieb

Lonza
 Bio-Rad Laboratories GmbH
 Miltenyi Biotech
 Promega GmbH
 QIAGEN
 BD Biosciences
 QIAGEN
 QIAGEN
 Agilent Technologies
 Thermo Scientific
 Applied Biosystems
 Invitrogen™

Enzyme

Antarctic Phosphatase
 rAPid Alkaline Phosphatase
 RNase A
 T4 DNA Ligase
 Taq-DNA-Polymerase
 Xbal

Hersteller/ Vertrieb

New England Bio Labs Inc.
 Roche
 Sigma Aldrich
 Thermo Scientific
 Promega GmbH
 Thermo Scientific

Marker und Ladepuffer

6x Loading Dye Solution
 GeneRuler™ DNA Ladder Mix
 (DNA-Größenstandard)
 Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder
 (Protein-Größenstandard)

Hersteller/ Vertrieb

Thermo Scientific

 Thermo Scientific

 Thermo Scientific

Vektoren und Oligos

miRIDIAN microRNA Mimics
 pcDNA3.1-Leervektor
 pcDNA3.1-RASSF1A

 pGL3-control-Vektor
 pCR-2.1®-TOPO®-Vektor
 psPAX2-Vektor
 pMD2.G-Vektor
 pmiR-ZIP™-miR-181a-Lentivektor
 pmiR-ZIP™-miR-181b-Lentivektor
 pmiR-ZIP™-miR-181a/181b-Lentivektor
 pmiR-ZIP™-control-Lentivektor
 pPACKH1 Lentivektor Packaging Kit
 pRFP-CB-shLenti-Vektor (Kontrolle)
 pRFP-CB-shLenti-Vektoren (A-D; RASSF1A)
 pRL0 (pRL-SV40 Renilla Luciferase reporter
 vector)

Hersteller/ Vertrieb/ Quelle

Dharmacon (GE Healthcare)
 Invitrogen™
 Prof. R. Dammann, Justus-
 Liebig-Universität Giessen
 Promega GmbH
 Invitrogen™
 Adgene
 Adgene
 Systembioscience
 Systembioscience
 Systembioscience
 Systembioscience
 Systembioscience
 Amsbio (Origene)
 Amsbio (Origene)
 Promega GmbH

Oligonukleotide zur microRNA- und mRNA-Detektion sowie Klonierung

Zur Detektion reifer microRNAs wurde der TaqMan™ MicroRNA Assay (life technologies; Thermo Scientific) verwendet.

<u>Spezies</u>	<u>Assay-Name</u>
homo sapiens	hsa-miR-181a; hsa-miR-181b; hsa-miR-181c; hsa-miR-181d; RNU6B (U6)
mus musculus	mmu-miR-181b-1*; mmu-miR-181b-2*; small nuclear RNA 135 (snoRNA135)

Primer zur mRNA-Amplifikation wurden manuell designed und von der Firma Biomers bezogen. Folgende Primer wurden zur Amplifikation der humanen RASSF1A 3'UTR sowie zur Mutagenese der miR-181-Bindestellen genutzt.

<u>Klonierungsprimer</u>	<u>Sequenz</u>
RASSF1A 3'UTR forward	5'-GTCTAGACCTCTTGTACCCCCAGGTGG-3'
RASSF1A 3'UT reverse	5'-GTCTAGAGAGGATCTTGAAATCTTTATTGAG-3'
RASSF1A 3'UTR-mut 1 forward	5'-GTGTTTTTTTATGAAGTGCGTCACTCTCTGTAATG TGTGGTGGCC-3'
RASSF1A 3'UTR-mut 1 reverse	5'-GGCCACCACACATTACAGAGAGTGACGCACTTC ATAAAAAACAC-3'
RASSF1A 3'UTR-mut 2 forward	5'-CAGGGTCTGTGTA ACTATGGGCACTGGCC-3'
RASSF1A 3'UTR-mut 2 forward	5'-GGCCAGTGCCCATAGTTACACAGACCCTG-3'
RASSF1A 3'UTR-mut 3 forward	5'-GAAAGGTTTTGGATCTCGCACGCGGTCTCAG GATATCC-3'
RASSF1A 3'UTR-mut 3 reverse	5'-GGATATCCTGAGACCGCGTGCGAGATCCAAA ACCTTTC 3'

qPCR-Primer

<u>qPCR-Primer</u>	<u>Sequenz</u>
GAPDH forward	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
GAPDH reverse	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'
RASSF1A forward	5'-ACCTCTGTGGCGACTTCATC-3'
RASSF1A reverse	5'-AACAGTCCAGGCAGACGAG-3'
C/EBP β forward	5'-CGTGTGTACACGGGACTGA-3'
C/EBP β reverse	5'-AAACGGAAAAGATTCCCAA-3'
GCSF-R forward	5'-ACCTGGGCACAGCTGGAGTGG-3'
GCSF-R reverse	5'-CAGGCTGCTGTGAGCTGGGTCTGG-3'

Sequenzierungsprimer

<u>Sequenzierungsprimer</u>	<u>Sequenz</u>
Luc-C FP	5'-AGA GAG ATC CTC ATA AAG GC-3'
EBV RP	5'-GTG GTT TGT CCA AAC TCA TC-3'

Antikörper**Primärantikörper – Western Blot**

		<u>Hersteller/ Vertrieb</u>
Anti-RASSF1A (3F3)	Maus, monoklonal	Abcam
Anti-RASSF1A	Kaninchen, polyklonal	Abcam
Anti-GAPDH (FL-335)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-RAR α (C-20)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Cyclin D1 (H-295)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-p53 (FL-393)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology

Sekundärantikörper – Western Blot

		<u>Hersteller/ Vertrieb</u>
HRP-konjugiertes anti-Kaninchen IgG	Ziege, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
HRP-konjugiertes anti-Maus IgG	Gans, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology

FACS-Antikörper

		<u>Hersteller/ Vertrieb</u>
APC-konjugierter anti-human CD11b/Mac-1	Maus IgG1, κ	BD Biosciences

APC-konjugierter		
anti-human CD114 (GCSF-R)	Maus IgG _{1,κ}	Biologend
APC-konjugierter IgG-Isotyp	Maus IgG _{1,κ}	BD Biosciences
PE-konjugierter		
anti-human CD11b/Mac-1	Maus IgG _{1,κ}	BD Biosciences
PE-konjugierter		
anti-human CD34	Maus IgG _{1,κ}	BD Biosciences
PE-konjugierter IgG-Isotyp	Maus IgG _{1,κ}	BD Biosciences

2.1.5 Biologisches Material

Bakterien

Escherichia coli XL-1blue
 One Shot® TOP 10
 Subcloning Efficiency™ DH5α™

Hersteller/ Vertrieb

Agilent Technologies
 Invitrogen™
 Invitrogen™

Zelllinien

		<u>Quelle</u>
HEK 293TN	humane, embryonale Nierenzellkarzinomzelllinie	ATCC
NB4	humane AML-Zelllinie (FAB M3)	DSMZ
HL60	humane AML-Zelllinie (FAB M2)	DSMZ
U937	humane AML-Zelllinie (Myeloblastenzellen)	ATCC
K562	humane CML-Zelllinie	ATCC
U937-PR9	humane Myeloblastenzellen, in welchen die humane PML/RARα-cDNA unter der Kontrolle eines Metallothionein-Promotors exprimiert wird (257).	
U937-PC18	humane Myeloblastenzellen, in welchen ein leeres Kontrollkonstrukt (pPC18) mit einem Metallothionein-Promotor exprimiert wird	

PML/RAR α -knock in-Mausmodell

Es wurden Knochenmarkszellproben von jeweils 5 C57Bl/6-mCG^{+PR}- und 5 C57Bl/6-WT-Mäusen zur Analyse der miR-181a/miR-181b-Expression und RASSF1A-Proteinmenge genutzt. In dem PML/RAR α -knock in-System wird das humane PML/RARA-Fusionsgen unter der Kontrolle des murinen *Cathepsin G*-Gens exprimiert, was zu einer blutgewebsspezifischen Expression des Fusionsprotein in hämatopoetischen Vorläuferzellen führt (258). Die Zellproben wurden von Prof. Pier Guiseppe Pelicci (IFOM-IEO Campus, Mailand, Italien) im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt.

Primärzellen und Patientenproben

Zur Quantifizierung der miR-181a- und miR-181b und der RASSF1A-mRNA wurde Total-RNA aus Knochenmarksproben von AML-Patienten und aus Leukapherisaten von Patienten mit soliden Tumoren isoliert. RNA-Proben von 6 APL-Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und einem Zeitpunkt während der Therapie wurden von Universitätsklinikum Münster zur Verfügung gestellt. Des Weiteren wurden Zell- bzw. RNA-Proben von AML-Patienten aus der OSHO-Datenbank der selbstständigen Abteilung Hämatologie/ Onkologie des Universitätsklinikums Leipzig und von der Universität Münster genutzt. Die Proben der nicht-AML-Patienten wurden vom Universitätsklinikum Halle zur Verfügung gestellt. Die Charakteristika der APL-Patientenproben sind in Tabelle 3 und die der AML-Patientenproben und der nicht-AML-Patienten in Tabelle 4 aufgeführt. Die Proben wurden mit schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten und Spender entsprechend der „Declaration of Helsinki“ von den Universitätskliniken Münster, Leipzig und Halle entnommen. Die Studienprotokolle zur Sammlung von Patientenproben wurden durch die zuständigen Ethikkomitees geprüft. Die Diagnose wurde anhand der Kriterien der FAB-Klassifikation gestellt.

Tabelle 3 Auflistung der untersuchten RNA-Proben von APL-Patienten mit molekularen und physiologischen Charakteristika.

APL			Datum der			
Patienten-	Diagnose	Morphologie	Proben-	Status	Alter	Material-
nummer		nach FAB	entnahme			quelle
1	t(15;17)	M3	25.05.2010	Erstdiagnose	58	Knochenmark
			20.07.2010	Remission		Knochenmark
2	t(15;17)	M3	14.04.2005	Erstdiagnose	44	Knochenmark
			22.05.2007	-		Knochenmark
3	t(15;17)	M3	02.04.2009	Erstdiagnose	55	Knochenmark
			07.01.2010	Wiederholung		Knochenmark
4	t(15;17)	M3	16.06.2009	Erstdiagnose	54	Knochenmark
			24.08.2010	Wiederholung		Knochenmark
5	t(15;17)	M3	29.04.2010	Erstdiagnose	20	Knochenmark
			26.08.2010	-		peripheres Blut
6	t(15;17)	M3	01.04.2009	-	19	Knochenmark
			10.12.2009	-		peripheres Blut

Tabelle 4 Auflistung der untersuchten RNA- und Proteinproben von AML-Patienten mit physiologischen und molekularen Charakteristika.

AML		Morphologie	Ge-				Art des
Patient	Diagnose	nach FAB	schlecht	Alter	Status	Materialquelle	Materials
1	keine AML	-	m	53	-	Leukapherisat	RNA/Protein
2	keine AML	-	-	-	-	Leukapherisat	RNA/Protein
3	keine AML	-	-	-	-	Leukapherisat	RNA/Protein
4	t(15;17)	M3	w	32	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA/Protein
5	t(15;17)	M3	w	31	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA/Protein
6	t(15;17)	M3	w	29	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA/Protein
7	t(15;17)	M3	m	50	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA/Protein
8	t(15;17)	M3	m	73	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA/Protein
9	t(8;21)	M2	m	40	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA/Protein
10	t(8;21)	M2	w	43	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA/Protein
11	t(8;21)	M2	w	54	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA/Protein
12	t(8;21)	M2	m	42	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA/Protein
13	t(8;21)	M2	m	42	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA/Protein
14	NK	M4/5	m	75	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA/Protein
15	NK	M1	m	72	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA/Protein
16	NK	M5	w	65	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA/Protein
17	NK	-	m	21	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA
18	NK	-	w	39	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA
19	NK	-	w	43	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA
20	NK	-	m	58	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA
21	FLT3-M	M1	w	58	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA/Protein
22	FLT3-M	M1	w	40	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA/Protein
23	FLT3-M	M4	m	74	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA/Protein
24	FLT3-M	M2	m	39	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA/Protein
25	FLT3-M	-	w	30	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA
26	FLT3-M	-	w	70	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA
27	KK	M5	m	73	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA/Protein
28	KK	M5	m	56	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA/Protein
29	KK	M1	m	60	Erstdiagnose	Knochenmark	RNA/Protein

NK = normaler Karyotyp; KK = komplexer Karyotyp; FLT3-M = FLT3-Mutation.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung eukaryotischer Zelllinien erfolgte nach Standardmethoden in Zellkulturflaschen. Die Zellen wurden im Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 96% relativer Feuchte und 5% CO₂ inkubiert.

Zusammensetzung der Kulturmedien

HEK 293TN	DMEM + 10% FBS + 1% P/S/G
NB4, U937, HL60	RPMI 1640 + 10% FBS + 1% P/S/G

U937-PR9 und U937-PC18-Zellen werden im Standardmedium unter Zusatz von 850 µg/ml G418 kultiviert. Zur Selektion pmiR-ZIPTM-exprimierender Zellen wurde dem Kulturmedium das Antibiotikum Puromycin (5 µg/ml) zugesetzt. Blasticidin (5 µg/ml) wurde zur Selektion pRFP-CB-shLenti-exprimierender Zellen genutzt.

2.2.2 Isolation CD34+ Progenitorzellen

Primäre humane hämatopoetische CD34+ Progenitorzellen wurden aus Leukapherisaten mittels Ficoll-Hypaque-Dichtengradientenzentrifugation mit anschließender Aufreinigung durch immunomagnetische Antikörper unter Nutzung eines CD34 MicroBead Kits für humane Zellen gewonnen. Die Durchführung der Isolation erfolgte nach Herstellerangaben. Die Reinheit der Zellen wurde durch Messung des CD34-Oberflächenmarkers mittels FACS bestimmt und lag bei ca. 95 %.

2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Teil der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer, welches ein definiertes Volumen besitzt, gegeben. Die Zellen in allen

vier Quadranten (mit jeweils 16 Einzelquadranten) wurden ausgezählt und anschließend auf das vorhandene Volumen der Zellsuspension umgerechnet.

2.2.4 Zytozentrifugation und May-Grünwald-Giemsa-Färbung

Zur mikroskopischen Untersuchung hämatopoetischer Suspensionszellen wurden diese auf Objektträger mittels Zentrifugation fixiert. Dafür wurden 2×10^4 bis 5×10^4 Zellen in 100 μ l Medium in einer Hettich Zentrifuge universal 16 in speziellen Zytowinkelkammern (Hettich Labtechnology) bei 600 x g für 10 min. zentrifugiert. Anschließend wurden die Objektträger aus der Zytowinkelkammer entnommen und luftgetrocknet.

Die Färbung der auf dem Objektträger fixierten Zellen erfolgte mittels May-Grünwald-Giemsa-Färbung (Pappenheim-Färbung). Die Färbelösung beinhaltet einen basischen Farbstoff (Methylenblau) und einen anionischen Farbstoff (Eosin). Methylenblau verbindet sich mit negativ geladenen Bestandteilen in den Zellen (Nukleinsäure in Kernen und Ribosomen) und gibt ihnen eine blaue bis violette Farbe. Eosin verbindet sich mit positiv geladenen Bestandteilen (zytoplasmatische Proteine), was ihnen eine rosa bis rote Farbe verleiht. Beide Reaktionen sind dabei stark pH-abhängig. Bei der Färbung wurden die fixierten Zellen zunächst für 3 - 5 min. in der unverdünnten May-Grünwaldlösung inkubiert. Daran schloss sich eine 15 - 20 minütige Inkubation in der Giemsa-Lösung (1:20 Verdünnung) an. Abschließend wurden die Objektträger in 1 x PBS-Lösung gewaschen und luftgetrocknet. Die mikroskopische Untersuchung und Digitalisierung der Zellen erfolgte bei einer Vergrößerung von 10 x 40 (Okular x Objektiv).

2.2.5 Differenzierung der Zellen

Die granulozytäre Differenzierung von NB4-, U937- und HL60-Zellen wurde mittels Zugabe von 1 μ M ATRA (all-trans-Retinsäure) induziert. Hierfür wurden 1×10^6 Zellen in 2 ml Medium in 6-Lochplatten ausplattiert und einmalig mit ATRA behandelt. Nach Transfektion von microRNA Mimic-Molekülen wurde die granulozytäre Differenzierung durch einmalige Zugabe von 0,1 μ M ATRA induziert. Zum

Ausschluss unspezifischer Effekte durch das Lösungsmittel DMSO wurden die Zellen in den Kontrollansätzen mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels behandelt.

2.2.6 Induktion des PML/RAR α -Fusionsproteins

In U937-PR9-Zellen wird die PML/RAR α -cDNA unter der Kontrolle eines Metallothionein-Promotors exprimiert. Zur Induktion des PML/RAR α -Fusionsproteins wurden 1×10^6 Zellen in 2 ml Medium in 6-Lochplatten ausplattiert und einmalig mit 100 μ M Zinksulfat (ZnSO₄) bzw. den entsprechenden Volumina des Lösungsmittels Wasser behandelt. Als Kontrolle wurde die Zelllinie U937-PC18 in entsprechender Weise behandelt.

2.2.7 Proliferationsassay

Zur Bestimmung der Proliferationsrate von NB4-Zellen, welche stabil die verschiedenen miR-ZIP-Konstrukte exprimieren, wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. Hierfür wurden die miR-ZIP-exprimierenden NB4-Zellen in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/ ml in einer 25 cm²-Flasche ausplattiert. Die Lebendzellzahlbestimmung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer nach Trypanblau-Färbung der Zellen. Dabei wird der polyanionische Azofarbstoff nicht in lebende Zellen eingeschleust. Diese erscheinen somit bei der Zellzählung weiß auf einem blauen Hintergrund, wohingegen tote Zellen blau gefärbt werden.

2.2.8 CFU-Assay und Koloniegrößenbestimmung

Die Fähigkeit zur Koloniebildung miR-ZIP-exprimierender NB4-Zellen wurde anhand eines „colony forming unit“-Assays (CFU-Assay) untersucht. Hierfür wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^3 Zellen/ ml in 1 ml Methylzellulose-basierendem Medium (MethoCult™ H4230) in einer 12-Loch-Platte ausplattiert. Jeder Ansatz wurde als Triplikat durchgeführt. Nach 6 Tagen wurden photographische Aufnahmen der Kolonien angefertigt. Die Kolonien wurden mit einer Vergrößerung von 10 x 5

(Okular x Objektiv) aufgenommen. Die Koloniegröße von 135 Kolonien wurde mit Hilfe der Software ImageJ bestimmt. Die Auswahl der Kolonien erfolgte nach dem Zufallsprinzip.

2.2.9 Replating-Assay

Zur Bestimmung des Einflusses des miR-ZIP-vermittelten *knock downs* von miR-181a und miR-181b auf die *self-renewal*-Kapazität der Zellen wurde ein serieller *replating*-Assay durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^3 Zellen/ml in 1 ml Methylzellulose-basierendem Medium (MethoCult™ H4230) in einer 12-Loch-Platte ausplattiert. Jeder Ansatz wurde als Triplikat durchgeführt. Nach jeweils 6 Tagen wurden die Zellen auf eine neue Platte replattiert. Das Replattieren der Ansätze erfolgte in der ersten Runde in einer Verdünnung von 1:25 und in der 2. Runde in einer Verdünnung von 1:100. Die Kolonien wurden fotografisch mit einer Vergrößerung von 10 x 5 (Okular x Objektiv) dokumentiert. Durch manuelle Auszählung und Mittelung der Replikate wurde die Gesamtzellzahl für jeden Ansatz bestimmt.

2.2.10 Durchflusszytometrie (FACS)

Das Verfahren der Durchflusszytometrie, auch FACS (*Fluorescence-activated Cell Sorting*) genannt, wird zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und zellulären Proteinen, Peptiden sowie DNA angewendet.

Zur Bestimmung der Menge spezifischer Oberflächenproteine (Antigene) wie CD11b und GCSF-R wurden die Zellen mit den entsprechenden Farbstoff-markierten Antikörpern den Herstellerangaben entsprechend inkubiert. Dabei wird grundlegend das Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion genutzt. Die Messung der somit markierten Zellen erfolgte am Durchflusszytometer bei den entsprechenden Wellenlängen in Abhängigkeit von dem gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff.

Die Bestimmung der Transduktionseffizienz nach lentiviraler Infektion von Zellen wurde anhand der Bestimmung der prozentualen Menge an GFP- (miR-ZIP) bzw. RFP-positiver (shRNA-RASSF1A) Zellen mittels FACS durchgeführt. Des Weiteren

wurde zur Selektion miR-ZIP-exprimierender Zellen die Zellisolation mittels FACS an einem BD FACS Aria III genutzt. Dabei wurden GFP-exprimierende Zellen aus der Gesamtzellpopulation isoliert.

Der Nachweis apoptotischer Zellen erfolgte unter Nutzung des PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I nach Herstellerangaben. Während der Apoptose werden Phospholipide (Phosphatidylserine; PS) von der inneren zur äußeren Zellmembran translokiert. An diese bindet das Fluorochrom-markierte Ca^{2+} -abhängige Phospholipid-bindende Protein Annexin V. Durch die Verwendung des Farbstoffes 7-AAD wurden zusätzlich spätapoptotische Zellen abgetrennt. Nur die zerstörten Membranen toter oder nekrotischer Zellen sind permeabel für den Farbstoff. Die Messung erfolgte mittels FACS.

Die Analyse des Zellzykluses wurde mittels Färbung der zellulären DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (PI) durchgeführt. PI interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäuren und hat eine sehr hohe Quantenausbeute (Exzitationswellenlänge = 488 nm, Emissionswellenlänge = 600 nm), welche mittels FACS gemessen wurde. In der Histogrammdarstellung der PI-Fluoreszenz findet man zwei deutliche Peaks, der vordere wird der G0/G1- Phase, d.h. dem einfachen DNA-Gehalt zugeordnet, der hintere gehört zur G2/M- Phase, d.h. zum doppelten DNA-Gehalt. Dazwischen liegt der Anteil der S-Phase, d.h. derjenigen Zellen, deren DNA gerade repliziert wird. Die Anfärbung der Zellen erfolgte nach folgendem Protokoll. Mit 1 x PBS gewaschene Zellen wurden durch tropfenweise Zugabe von 3 ml eiskaltem 70% Ethanol unter leichtem Vortexen und einstündiger Inkubation auf Eis fixiert und permeabilisiert. Durch Zentrifugation bei 4°C und 400 x g für 5 min. wurden die Zellen pelletiert und anschließend mit 2 x 1 ml PI-Färbepuffer gewaschen. Gefolgt von einem Zentrifugationsschritt bei 400 x g für 5 min. Nach Überführung der Zellsuspension in FACS-Röhrchen wurde 100 µl RNase A (1mg/ml) zugesetzt, um doppelsträngige RNA-Moleküle zu entfernen. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 30 min. Die Färbung der DNA erfolgte durch Zugabe von 10 µg PI-Lösung (1 mg/ml) und Inkubation der Proben für 30 min. in Dunkelheit und bei Raumtemperatur.

PI-Färbepuffer: 1 x PBS; 2% FBS; 0,01% NaN_3

Alle Messungen wurden am Durchflusszytometer FACS Calibur bzw. LSR II durchgeführt und jeweils eine Mindestanzahl von 10000 Ereignissen dokumentiert. Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mittels CellQuest-Software bzw. Cyflogic.

2.2.11 RNA-Extraktion

Die Isolation der Gesamtzell-RNA aus Säugerzellen erfolgte durch Zugabe von 1 ml TRIzol®. Diese Lösung enthält Phenol und Guanidiniumthiocyanat in einphasiger Lösung. Anschließend wurden 200 µl Chloroform dazugegeben, die Proben vorsichtig mehrfach invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phasentrennung in eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine milchige Interphase und eine obere farblos-wässrige Phase erfolgte in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C und einer Geschwindigkeit von 13000 rpm für 15 min. Die in der oberen Phase gelöste RNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und somit von DNA und Proteinen, welche sich in den anderen Phasen befinden, getrennt. Die Präzipitation der RNA erfolgte durch Zugabe von 700 µl Isopropanol. Nach Durchmischung und 10-minütiger Inkubation der Reaktion bei Raumtemperatur wurde die RNA durch 10-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Zum Waschen der RNA wurde 1 ml 70%-igem Ethanol zugegeben und dann 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde anschließend luftgetrocknet und in RNase/DNase-freiem-Wasser gelöst. Die Lagerung der extrahierten RNA erfolgte bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C.

2.2.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Qualitäts- und Quantitätsbestimmung von Nukleinsäuren wurde mittels eines Spektralphotometers (Nano-Photometer™) durchgeführt. Die Konzentration wurde anhand photometrischer Absorptionsmessung bei 260 nm für Nukleinsäuren und 280 nm für Proteine und Berechnung der optischen Dichte (OD) ermittelt. Ein A_{260}/A_{280}

Quotient von 1,8 (RNA) bzw. 2,0 (DNA) wurde als Richtwert für die Reinheit der Proben genutzt.

2.2.13 cDNA-Synthese

Das Überführen von mRNA (*messenger RNA*) in cDNA (*complementary DNA*) erfolgte unter Verwendung der retroviralen Reversen Transkriptase. Diese Reaktion ermöglicht die Anwendung der PCR-Technik für die RNA-Analytik.

Für die Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion wurde das Revert Aid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit den Herstellerangaben entsprechend verwendet. In der RT-Reaktion wurde je Probe 100 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Dem Ansatz wurden jeweils 1 µl Oligo-(dT)-Primer, 4 µl 5-fach Reaktionspuffer, 2 µl dNTP Mix (10 mM), 0,5 µl RiboLock-RNase-Inhibitor und 1 µl Reverse-Transkriptase (200 U, Revert Aid™ H Minus M-Mul V Reverse Transcriptase) sowie RNase/DNase-freies Wasser zu einem Gesamtvolumen von 20 µl zugegeben. Die Umschreibung der mRNA in cDNA erfolgte bei 42°C für 60 min. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70°C für 15 min abgestoppt. Das entstandene cDNA-Gemisch wurde direkt für die anschließende PCR verwendet bzw. bei -20°C gelagert.

2.2.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die spezifische Vervielfältigung von Nukleinsäuren *in vitro* wurde durch die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* – PCR) erzielt. Die PCR ermöglicht die Amplifikation eines DNA-Fragments (Template) über einen Bereich, der von zwei synthetischen DNA-Oligonukleotiden (Primer), die zum Template komplementär sind, flankiert wird. Bei der PCR handelt sich um einen mehrstufigen Prozess. In der initialen Denaturierungsphase (5 min bei 95°C, *Hot Start*) wird die doppelsträngige DNA aufgeschmolzen. Daran schließt eine Abfolge von 30-40 Zyklen mit den Reaktionsschritten: Denaturierung (thermischem Aufschmelzen des Templates zu Einzelsträngen; 30-60 s bei 95°C), *Annealing* (Primerhybridisierung an einzelsträngige Template-DNA; 10-60 s bei 50-66°C) und Primerextension (30-60 s bei 72°C). Durch die zyklische Wiederholung dieser Schritte kommt es zu einer

exponentiellen Amplifikation der Zielsequenz. Ein finaler Extensionsschritt (5 min bei 72°C) komplettiert unvollendete Extensionsschritte. Die verwendeten Reaktionszeiten und Temperaturen sind von der Länge der Amplifikate und den spezifischen Sequenzen abhängig. Die PCR wurde für qualitative und quantitative Zwecke, wie RNA-Analyse, Klonierung und Mutagenese eingesetzt. Für Standardanwendungen sowie für Klonierungen wurde die hitzestabile *Taq*-DNA-Polymerase und für die Mutagenese die *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet.

2.2.14.1 Semiquantitative PCR

Die semiquantitative PCR wurde für die Klonierung der RASSF1A 3'UTR in den PGL3-Kontrollvektor eingesetzt. Für die Standardreaktion wurde ein 20 µl Ansatz bestehend aus 2 µl cDNA, jeweils 1 µl des entsprechenden Primerpaares (10 pmol), 2 µl dNTP-Mix (10 µM), 2 µl Reaktionspuffer, 2 µl MgCl₂ und 0,3 µl *Taq*-DNA-Polymerase (2,5 U) und 9,7 µl RNase/DNase-freies Wasser eingesetzt. Die PCR wurde in einem ThermoCycler T Gradient Thermoblock bzw. Thermal Cycler T100 durchgeführt. Die verwendeten Primer sind unter 2.1.4 (Oligonukleotide zur microRNA- und mRNA-Detektion) aufgelistet.

2.2.14.2 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real time-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR und ermöglicht die quantitative Analyse der DNA durch Fluoreszenzmessung in Echtzeit. Dabei nimmt die Fluoreszenzintensität proportional zur gebildeten DNA-Menge zu. Für die Reaktionen wurde das QuantiTect® SYBR Green PCR Kit verwendet. SYBR Green I ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, der sich in die kleine Furche doppelsträngiger DNA einlagert. Der resultierende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge $\lambda_{\max} = 494$ nm und emittiert grünes Licht bei $\lambda_{\max} = 521$ nm. Am Ende der PCR lässt sich aus den gewonnenen Daten die exponentielle Phase bestimmen, an deren Beginn eine Schwelle (*threshold*) gelegt wird, um jeder PCR-Messkurve eindeutig einem PCR-Zyklus-Wert zuordnen zu können, bei der das Fluoreszenz-Signal diesen Schwellenwert

durchbricht (C_T -Wert, *threshold cycle*). Zur Überprüfung der Spezifität der Reaktion schließt sich an den letzten Zyklus eine Schmelzkurve an. Dabei wird das PCR-Produkt in Abhängigkeit von Basenzusammensetzung und Länge bei einer spezifischen Temperatur aufgeschmolzen. Die Reaktionen erfolgten in einem Rotor-Gene™ 3000, Real Time Thermal Cycler sowie im Real Time PCR System 7500. Zur Normalisierung der Werte wurde die mRNA des *housekeeping*-Gens GAPDH gemessen. Die Berechnung erfolgte mittels relativer Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Der *fold change* der exprimierten Gene wurde relativ zum Kontrollgen nach folgender Formel berechnet.

$$2^{-\Delta(\Delta C_T)} \quad (\Delta C_T = C_{T, \text{Zielgen}} - C_{T, \text{Kontrollgen}}, \Delta(\Delta C_T) = \Delta C_{T, \text{stimuliert}} - \Delta C_{T, \text{Kontrolle}})$$

2.2.14.3 MicroRNA-Quantifizierung mittels qPCR

Die Analyse der microRNA Expression erfolgte unter Verwendung der entsprechenden TaqMan® MicroRNA Assays nach Herstellerangaben auf der Grundlage der Methode der quantitativen Real-Time PCR. Abweichend davon wird beim TaqMan-Assay neben den flankierenden Primern zusätzlich eine 5'-FAM™-markierte TaqMan-Sonde, welche einen nichtfluoreszierenden Quencher (NFQ) am 3'-Ende besitzt, eingesetzt. Durch die 5'-3'-Exonukleas-Aktivität der Polymerase kommt es zum Abbau der Sonde am 5'-Ende und zur Entfernung des Quenchers vom Fluorophor. Infolge dessen wird eine Erhöhung der Reporter-Fluoreszenz gemessen. Die verwendeten Primer sind unter 2.1.4 (Oligonukleotide zur microRNA- und mRNA-Detektion) aufgelistet. Zur Normalisierung in humanen Zellen wurde die Expression der RNUB6 und in murinen Zellen die Expression der snoRNA135 gemessen.

2.2.15 Agarose-Gelelektrophorese

Zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten für die Klonierung wurden Agarosegele genutzt. Nach einer semiquantitativen PCR wurden die Reaktionsprodukte in einem 1,5%-igen Agarosegel elektrophoretisch anhand der

Größe aufgetrennt. Dabei verhält sich die Laufstrecke umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge. Durch Anfärbung des Agarosegels mit DNA-interkalierendem Ethidiumbromid bzw. GelRed sowie durch Verwendung eines DNA-Größenstandards wurden die DNA-Banden in einem Geldokumentationsgerät visualisiert und analysiert.

2.2.16 Klonierung

Unter dem Prozess des Klonierens versteht man das Einbringen von DNA-Fragmenten in zirkuläre, autonom replizierende Vektoren mit dem Ziel der Vervielfältigung und weiteren Analyse. Das gewünschte DNA-Fragment wird aus genomischer DNA bzw. cDNA mit Hilfe spezifischer Primer mittels PCR amplifiziert. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Detektion des DNA-Fragments im Agarosegel wird dieses ausgeschnitten und mittels QIAEX® II Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben isoliert. Die Verknüpfung von DNA-Fragment und Zielvektor erfolgt in einer Ligasereaktion mittels T4-Ligase nach Herstellerangaben. Das Ligationsprodukt wird in einer Transformationsreaktion in kommerziell erworbene kompetente Bakterienzellen (DH5 α , Escherichia coli XL-1blue, One Shot® TOP 10, Subcloning Efficiency™ DH5 α ™) eingebracht. Dabei wird die bakterielle Zellwand durch Hitzeschock für die DNA permeabel gemacht. Hier variieren Zeit und Temperatur in Abhängigkeit vom Bakterienstamm.

Die Vermehrung und Selektion einzelner Bakterienklone erfolgte unter Verwendung von Antibiotika auf LB-Agar-Platten bei 37°C im Inkubator über Nacht (12-16h). Eine weitere Vermehrung einzelner Plasmid-tragender Bakterienklone erfolgte in einer 1 ml LB-Kultur unter Verwendung von Antibiotika bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator.

LB-Medium: 5 g Hefeextrakt
 5 g NaCl
 10 g Trypton
 gelöst in 1 l destilliertem Wasser, autoklaviert.

LB-Agar: LB-Medium
 1,5 % Agar-Agar, autoklaviert.

Die Isolation der Plasmid-DNA aus den Bakterienkulturen erfolgte durch Mini-Plasmidpräparation mittels QIAprep® Spin Miniprep Kit nach Herstellerangaben. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde photometrisch bestimmt. Die Sequenz des Inserts wurde anhand einer Sequenzierungsreaktion überprüft. Die Isolierung der größerer Plasmid-DNA-Mengen aus Bakterienkulturen erfolgte durch Nutzung des HiSpeed® Plasmid Maxi Kits entsprechend den Herstellerangaben.

Für die Klonierung der RASSF1A 3'UTR (NCBI Reference Sequence: NM_007182.4) wurde die komplette 795 Basen-lange 3'UTR aus cDNA von NB4-Zellen, welche 48h mit ATRA behandelt wurden, mittels Taq-Polymerase amplifiziert. Durch die Verwendung spezifischer Primer (2.1.4 Oligonukleotide zur microRNA- und mRNA-Detektion sowie Klonierung) wurde an beiden Enden der amplifizierten DNA-Sequenz jeweils eine *Xba*I-Schnittstelle generiert. Anschließend wurde die gereinigte 3'UTR in den pCR-2.1®-TOPO®-Vektor kloniert. Mittels *Xba*I-Restriktionsverdau wurde die RASSF1A 3'UTR isoliert. Die Klonierung der RASSF1A 3'UTR in den pGL3-control-Vektor erfolgte über die *Xba*I-Restriktionsschnittstelle, welche sich zwischen Luziferasegen und Poly-A-Sequenz des Vektors lokalisiert ist. Vorbereitend dafür wurde der pGL3-control-Vektor mittels *Xba*I-Restriktionsverdau linearisiert. Die Dephosphorylierung des Vektors erfolgte nach Herstellerangaben durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase (*rAPid Alkaline Phosphatase*). Nach Transformation wurden die Plasmid-tragenden Bakterien durch Zusatz von Ampicillin selektiert.

2.2.17 *In-vitro*-Mutagenese

Die gezielte Modifizierung der Basensequenz eines klonierten DNA-Abschnittes bezeichnet man als *in-vitro*-Mutagenese. Veränderungen können z.B. Deletionen, Insertionen und Substitutionen einzelner Basenpaare oder ganzer DNA-Abschnitte sein.

Die Mutation der RASSF1A 3'UTR (pGL3-RASSF1A 3'UTR-Vektor) erfolgte unter Verwendung des QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kits entsprechend den Herstellerangaben. Die Mutationen wurden durch Verwendung spezifischer

Primer erzielt (siehe 2.1.4 Oligonukleotide – Klonierungsprimer). Diese Primer überspannen jeweils eine miR-181-Bindestelle und variieren in jeweils 4 Basen von der komplementären RASSF1A 3'UTR-Sequenz. Mittels PCR fand eine spezifische Vervielfältigung der Plasmide statt, welche die mutierten Bindestellen tragen. Durch Sequenzierung des Vektors wurden die Mutationen kontrolliert (siehe 2.1.4 Sequenzierungsprimer).

2.2.18 Transiente Transfektion mittels Elektroporation

Das Einbringen von DNA in eine eukaryotische Zelle mit dem Ziel der temporären Expression eines Gens, bezeichnet man als Transfektion. Bei der Transfektion mittels Elektroporation wird mittels kurzer elektrischer Pulse eine kurzzeitig erhöhte Permeabilität der Zellmembran erzeugt, die eine Diffusion der DNA ins Zellinnere ermöglicht. Die Transfektion der microRNA Mimic-Moleküle sowie der verschiedenen Vektoren wurde mittels eines Elektroporationsgeräts (Nucleofector® 2b Device) unter Verwendung des AMAXA™ Nucleofector Cell line Kit V und C nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.19 Lentivirus-Herstellung und virale Transduktion

Lentiviren sind eine Gattung innerhalb der Familie der Retroviren (Reverse Transkriptase Onkoviren). Sie sind ummantelte Einzel(+)-Strang-RNA-Viren und können im Gegensatz zum Gammaretrovirus auch nicht teilungsaktive, eukaryotische Zellen infizieren. Das einfache provirale Genom enthält drei Gene und zwei Long Terminal Repeats (LTRs). Die Informationen zur Steuerung der viralen Genexpression enthalten. *Gag* (Gruppenspezifisches Antigen) kodiert die Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine. *Pol* kodiert die viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase (mit RNase H) und Integrase. *Env* kodiert virale Hüllproteine. In der gentechnischen Anwendung werden bei der Erzeugung von künstlichen viralen Vektoren Hüllproteine zur Verbesserung der Stabilität und Infektion ausgetauscht (Pseudotypisierung). Bei der Transduktion (auch Infektion) mittels Lentiviren wird

Fremd-DNA in Zielzellen eingebracht. Die resultierende Integration der Fremd-DNA ins Wirtsgenom führt zur stabilen Expression der inserierten DNA.

Die Herstellung der lentiviralen Partikel für die stabile Expression der mir-ZIP-Konstrukte sowie der shRNA-Konstrukte wurde in 293TN-Zellen vorgenommen. Vorbereitend wurden 50000 Zellen pro cm^2 in einer 175 cm^2 -Zellkulturflasche ausgebracht. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Ziel-DNA sowie der Verpackungsplasmide psPAX2 (gag/pol) und pMD2.G(vsv-g).

Transfektionsansatz: 20 μg Ziel-DNA
 15 μg psPAX2
 10 μg pMD2.G
 gelöst in 1ml Opti-MEM + 135 μl PEI (1:1000 Verdünnung)

Der Ansatz wurde 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in 11 ml DMEM (*high glucose*), versetzt mit 2% FBS, verdünnt. Die Medium-DNA-Mixtur wird auf die mediumfreien Zellen gegeben und 4 h im Begasungsbrutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium durch 12 ml frisches DMEM (*high glucose*)-Kultivierungsmedium ersetzt. Die Zellen wurden anschließend 3 Tage im Begasungsbrutschrank inkubiert, wobei ein täglicher Mediumwechsel durchgeführt wurde. Der erhaltene Überstand wurde bei 1500 rpm für 7 min. zentrifugiert. Durch Zugabe von PEG-it™ *Virus Precipitation Solution* und 3-tägiger Inkubation bei 4°C wurden die Viruspartikel präzipitiert. Das Pelletieren der viralen Partikel erfolgte durch Zentrifugation bei $4500 \times g$ für 1 h bei 4°C . Das Pellet wurde in einem Hundertstel des Ausgangsvolumens in PBS gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Die Infektion der Zielzellen (NB4-Zellen) erfolgte in 12-Loch-Platten. Dafür wurden 100000 Zellen einmalig bzw. zweimalig in einem Abstand von 24h mit jeweils 1 μl der aufkonzentrierten Viruspartikel transduziert und im Begasungsbrutschrank inkubiert. Die Insertion der Ziel-DNA wurde nach 3 Tagen mikroskopisch und mittels FACS überprüft.

2.2.20 Luziferase-Reporter-Assay

Reportergenkonstrukte werden zur Charakterisierung eukaryotischer Genexpressionen eingesetzt. Dabei lassen sich sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen treffen. Als Reportergene werden vornehmlich Expressionskonstrukte genutzt, die Proteine kodieren, welche einfach und mit hoher Sensitivität nachweisbar sind. Beim Luziferase-Reporter-Assay nutzt man das hochsensitiv nachweisbare Enzym Luziferase. Mittels eines Luminometers werden die Photonen, die durch katalytische Oxidation des Luziferins entstehen, gemessen. Eine spezielle Form ist der Dual-Luciferase™ Reporter-Assay. Hier werden innerhalb eines Systems zwei verschiedene Luziferase-Proteine simultan exprimiert und gemessen. Die *Firefly (Photinus pyralis)*-Luziferase ist als Reporter im Luziferase-Reporterkonstrukt vorhanden. Die *Renilla (Renilla reniformis)*-Luziferase steht unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors und dient bei Kotransfektion als Kontrollreporter (pRL0). Der Dual-Luciferase™ Reporter-Assay wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

2.2.21 Isolation von Proteinen und Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Gewinnung von Proteinen aus Säugerzellen erfolgte durch RIPA-Lyse. Hierfür wurden 1 Million Zellen in 100 µl RIPA-Puffer, welchem PMSF, DTT und Protease-Inhibitor-Cocktail jeweils frisch zugesetzt wurde, gelöst. Nach einstündiger Inkubation auf Eis wurden unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 15 min bei 4°C abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode unter Nutzung des Bio-Rad Protein Assays. Dabei wurde die Absorption bei 595 nm photometrisch gemessen und anhand einer zuvor angelegten BSA-Eichkurve die Proteinmenge bestimmt.

RIPA-Puffer: 150 mM NaCl
1 % IGEPAL® CA-630
0,5 % Natriumdesoxycholat
50 mM Tris; pH 8,0

+ 1/10 Volumen PMSF (100 mM)
+ 1/10 Volumen DTT (10 mM)
+ 1/10 Volumen Protease-Inhibitor-Cocktail

2.2.22 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Proteine besitzen als amphotere Makromoleküle einen unterschiedlichen großen Anteil an positiv (Lysin, Arginin) und negativ geladenen (Asparaginsäure, Glutaminsäure) sowie ionisierbaren (z. B. Histidin, Cystein) Aminosäureresten. Die elektrophoretische Mobilität in einer porösen Gelmatrix ist daher neben der Größe und Form auch von der Nettoladung unter den jeweiligen Bedingungen abhängig. Die Auftrennung von Proteinen nach Größe ist nach Behandlung mit der anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) zusammen mit Schwefelbrücken-spaltenden Thiolreagenzien, wie z. B. β -Mercaptoethanol, in einer diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese möglich. In einem vertikalen Gelelektrophoresesystem passieren die Proben zunächst ein Sammelgel und anschließend ein Trenngel, in welchem die Proteine aufgrund ihrer molekularen Größe getrennt werden. 30-60 μ g gelöstes Protein, wurde mit Proteinladepuffer gemischt und anschließend für 10 min bei 95°C hitzedenaturiert. Die Proteine sowie eine farbstoffmarkierte Standardproteinmischung (Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder) zur Molekulargewichtsabschätzung wurden auf das Gel aufgetragen und durch Anlegen einer Spannung von 150 V für 1h aufgetrennt.

Sammelgel:	Aqua dest.	Trenngel:	Aqua dest.
	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)		0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
	30% Acrylamid		30% Acrylamid
	10% SDS		10% SDS
	10% APS		10% APS
	TEMED		TEMED

Proteinladepuffer: Aqua dest
 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
 10% Glycerol
 20% 10%-iges SDS (w/v)
 5% β -Mercaptoethanol
 0,05% (w/v) Bromphenolblau

2.2.23 Western Blot

Die Visualisierung spezifischer Proteine in einem Membran-fixierten Proteingemisch mittels Antikörperbindung bezeichnet man als Western Blot. Die aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch, durch Anlegen einer Spannung von 150 mA für 1h, aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Überprüfung der Effizienz des Transfers der Proteine auf die Membran erfolgte mittels Ponceau S-Färbung der Membran. Vor der Nachweisreaktion mittels spezifischer Antikörper wurde die Membran in einer 5%-igen Trockenmilchlösung für 1h inkubiert, um überschüssige Proteinbindestellen zu saturieren und unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Zum Nachweis der Proteine wurde die Membran zuerst mit einem spezifischen gegen das nachzuweisende Protein gerichteten Primärantikörper bei 4°C für mindestens 16 h inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit einem sekundären gegen konstante Bereiche des ersten Antikörpers gerichteten Antikörper bei RT für eine Stunde. Der Sekundärantikörper ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert, welches durch Wasserstoffperoxid oxidiert und anschließend in dieser Form mit Luminol reagiert. Dies wiederum bewirkt eine Chemilumineszenz, welche als Schwarzfärbung auf einem Röntgenfilm oder im LI-COR C-DiGit® Blot Scanner detektierbar ist. Als Substrat für die HRP wurde das

WesternSure™ Chemiluminescent Substrat der Firma LI-COR benutzt. Die Quantifizierung der Bandenintensität erfolgte mittels der Software ImageJ.

2.2.24 Statistik

Für die statistische Auswertung der durchgeführten Experimente wurde der Student *t* Test für abhängige und unverbundene Stichproben verwendet (Excel, Microsoft, USA). Unterschiede von $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) wurden als statistisch signifikant gewertet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Balkendiagramme wurden mit Excel und die Box-Whisker-Plots mit SPSS 17 erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 ATRA führt zur Reduktion der miR-181a/miR-181b-Expression in APL-Zellen *in vitro* und *in vivo*

In der klinischen Therapie der akuten Promyelozytenleukämie (APL) wird das Vitamin A-Derivat all-trans Retinsäure (ATRA) zur Behandlung eingesetzt und führt in Kombination mit Chemotherapie zu sehr guten Heilungsraten. Die verwendeten pharmakologischen Dosen ATRA führen zur Differenzierung der APL-Blasten *in vitro* und *in vivo*. Dieser Prozess geht mit gravierenden molekularen und morphologischen Veränderungen der Zellen einher (54), (259).

3.1.1 ATRA führt zur granulozytären Differenzierung von APL-Blasten und differentieller Expression der miR-181 Familie *in vitro*

Am Beginn der Arbeit stand die Etablierung des NB4-Zellkultursystems als *in vitro*-Modell der APL. Die granulozytäre Differenzierung wurde durch die einmalige Gabe von 1 µg/L (10^{-6} M) ATRA induziert. Als Kontrolle wurde ein zur ATRA-Lösung äquivalentes Volumen des Lösungsmittels DMSO auf die Kontrollzellen appliziert. Die Untersuchung des Differenzierungsstatus der Zellen erfolgte morphologisch mittels May-Grünwald-Giemsa-Färbung und Analyse der CD11b-Expression mittels FACS nach 72h. Die ATRA-behandelten Zellen wiesen nach May-Grünwald-Giemsa-Färbung nierenförmig-veränderte Zellkerne auf, welche in der DMSO-behandelten Kontrolle nicht nachweisbar waren (Abb. 6, links). Auch die Expression des Oberflächenmarkers CD11b war signifikant nach Behandlung mit ATRA im Vergleich zur DMSO-Kontrolle erhöht (Abb. 6; mitte). Des Weiteren wurde nach 24h, 48h und 72h die Expression der granulozytären Transkriptionsfaktoren C/EBPβ und C/EBPε mittels qPCR gemessen. Dabei zeigte sich, dass ATRA bereits nach 24h zu einer starken Induktion von C/EBPβ und C/EBPε führt (Abb. 6; rechts).

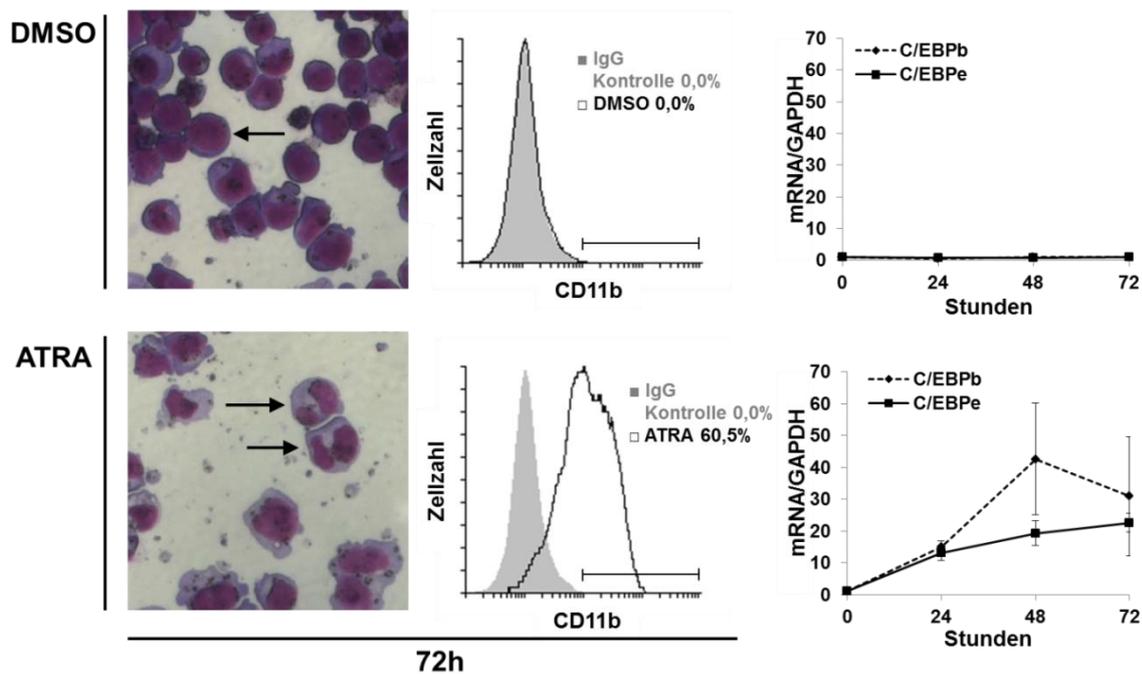


Abbildung 6 ATRA führt zur molekularen und morphologischen Differenzierung von APL-Zellen.

NB4-Zellen wurden einmalig mit ATRA (10^{-6} M; unten) oder dem Lösungsmittel DMSO (oben) behandelt. Nach 72h wurden "Cytospins" von den Zellen angefertigt und einer May-Grünwald-Färbung unterzogen (links). Die Pfeile kennzeichnen die nach ATRA-Behandlung charakteristisch nierenförmig veränderten Zellkerne bzw. die unveränderten Zellkerne nach DMSO-Behandlung. In der Mitte ist ein repräsentatives Histogramm der mittels Durchflusszytometrie analysierten CD11b-Expression der NB4-Zellen zum 72h-Zeitpunkt dargestellt. Die Prozentzahlen geben den Anteil CD11b-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl an. IgG Kontrolle = IgG Isotyp-Kontrolle. Das Diagramm rechts zeigt die Messung der mRNA-Menge der granulozytenspezifischen Transkriptionsfaktoren C/EBP β und C/EBP ϵ mittels qPCR im Zeitverlauf (rechts). Die Normalisierung erfolgte zu GAPDH.

Der Prozess der ATRA-abhängigen granulozytären Differenzierung ist mit der Veränderung der Expression von proteinkodierenden und nicht proteinkodierenden Genen verbunden. In diversen Publikationen wurden bereits veränderte Expressionsmuster von microRNAs infolge ATRA-induzierter Differenzierung von APL-Blasten beschrieben (125), (142). In diesem Zusammenhang konnten unter anderem miR-223 und Mitglieder der miR-181-Familie nachgewiesen werden. Mittels qPCR wurde die Expression von miR-223 und der miR-181-Familie analysiert. Die Resultate zeigten, dass nach 24h eine ca. 3-fache Induktion der miR-223-Expression nachweisbar war, wohingegen die Expression der miR-181-Familie durch ATRA im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen stark reprimiert wurde (Abb. 7).

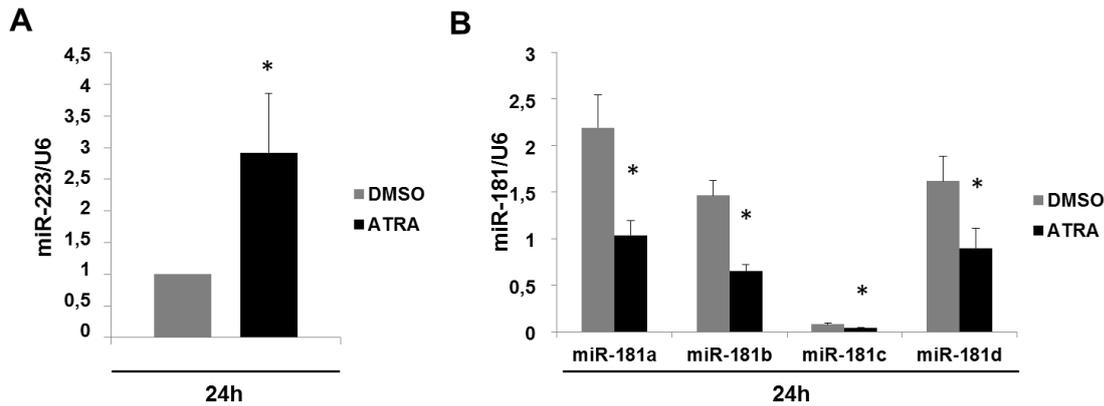


Abbildung 7 ATRA-abhängige Expressionsminderung der miR-181-Genfamilie in NB4-Zellen.

Analyse der miR-223- und 181a-d-Expression mittels qPCR 24h nach ATRA- bzw. DMSO-Applikation. Die Expressionswerte der miR-223 sind als *fold-change* und die der miR-181-Familie als ddCT-Werte dargestellt. Die Normalisierung erfolgte zur Expression der U6. * $p \leq 0,05$.

3.1.2 Die ATRA-vermittelte Reduktion der miR-181a/miR-181b-Expression ist APL-spezifisch

Die ATRA-abhängige Repression des miR-181a/miR-181b-Clusters in der APL wurde bereits in Arbeiten von Su et al. (170), Careccia et al. (212) und Garzon et al. (125) beschrieben. Aufgrund dessen und der eigenen Daten stellte sich die Frage, ob es sich bei der ATRA-induzierten Repression des microRNA-Clusters um einen allgemeinen ATRA-abhängigen Effekt handelt oder ein APL-spezifischer Regulationsmechanismus vorliegt. Hierfür wurden NB4-Zellen sowie die nicht APL-Zelllinien U937 und HL60 mit 1 μ M ATRA einmalig behandelt. Der Nachweis der Differenzierung erfolgte nach 72h durch Messung der ATRA-abhängigen Zunahme des CD11b-Oberflächenmarkers mittels FACS (Abb. 8 A-C). Die Expression von miR-181a und miR-181b wurde mittels qPCR untersucht. Dabei konnte in NB4-Zellen eine signifikante Repression der miR-181a/miR-181b-Expression nach ATRA-Behandlung in Vergleich zur DMSO-Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 8 D). In U937- und HL60-Zellen war hingegen keine ATRA-abhängige Regulation des miR-181a/miR-181b-Clusters zu beobachten (Abb. 8 E, F).

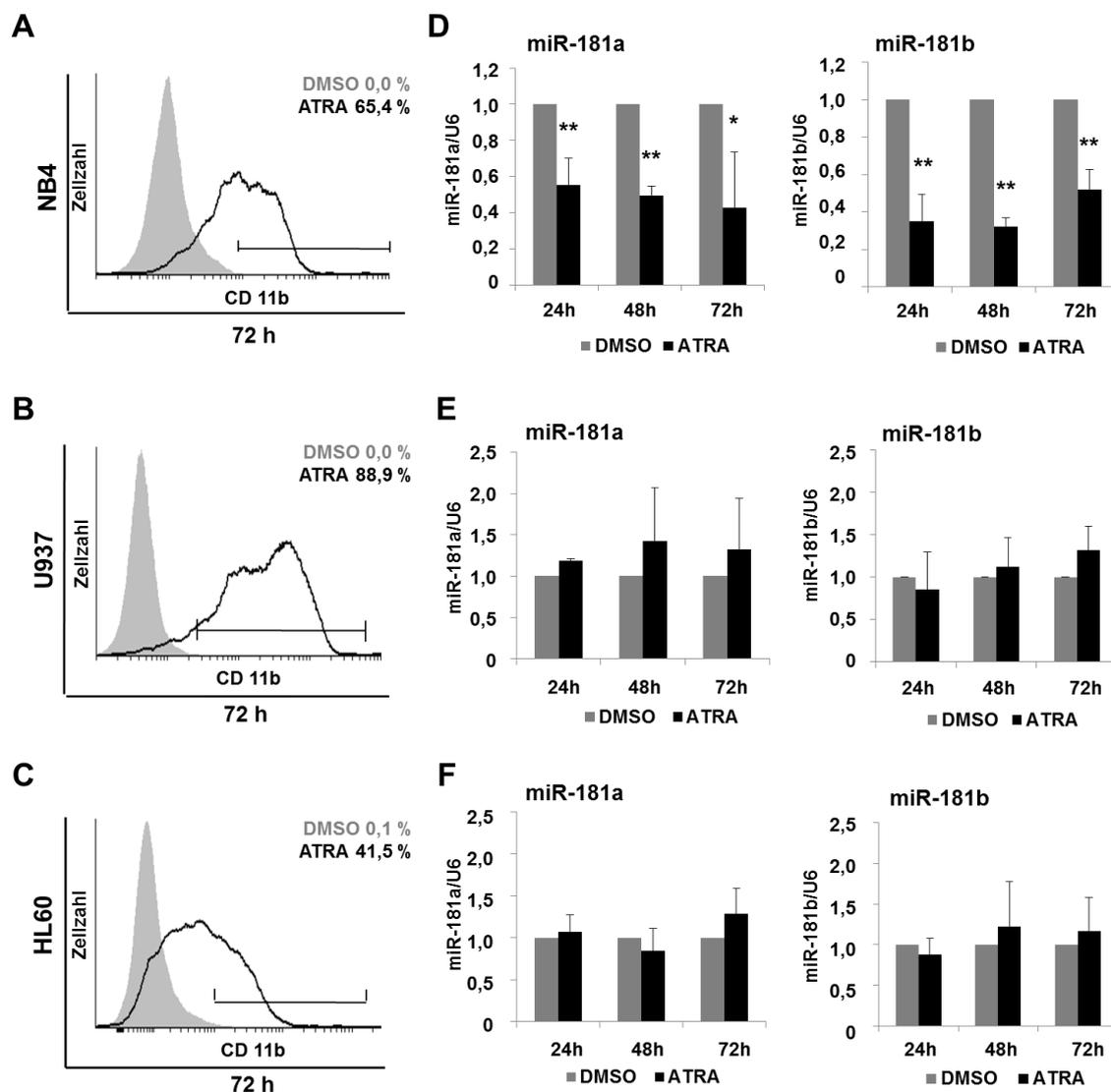


Abbildung 8 ATRA führt zur spezifischen Erniedrigung der miR-181a/miR-181b-Expression in NB4-Zellen.

NB4-, U937- und HL60-Zellen wurden einmalig mit 10^{-6} M ATRA bzw. DMSO behandelt. Nach 72h wurde die CD11b-Expression mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Prozentzahlen geben den Anteil CD11b-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl an. (A-C). Die miR-181a- und miR-181b-Expression in den Zellen wurde nach 24h, 48h und 72h mittels qPCR bestimmt (D-F). Die Expression der U6 wurde zur Normalisierung genutzt. * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$.

3.1.3 Verminderte miR-181a/miR-181b-Expression in APL-Patienten nach ATRA-Therapie

Neben den *in vitro*-Expressionsanalysen wurden auch Untersuchungen zur miR-181a- und miR-181b-Expression in Knochenmarks- und Blutzellproben von 6 APL-

Patienten, welche mit einer ATRA-basierenden Therapie behandelt wurden, durchgeführt. Für die Untersuchungen standen RNA-Proben zum Diagnose-Zeitpunkt und zu einem Zeitpunkt während der ATRA-basierenden Therapie zur Verfügung (siehe 2.1.5.; Tabelle 3). Die Analyse der Proben mittels qPCR zeigte, dass die Behandlung der Patienten mit pharmakologischen Dosen ATRA zu einer hoch signifikanten Repression der miR-181a- und miR-181b-Expression in den Zellen des Knochenmarks und des Blutes der Patienten führt (Abb. 9).

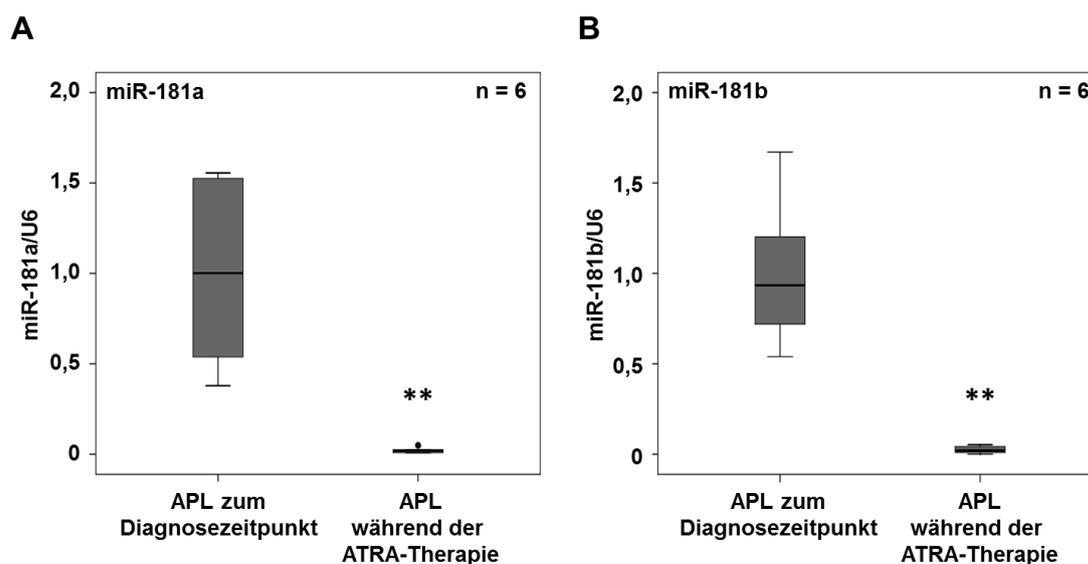


Abbildung 9 Verminderte miR-181a/miR-181b-Expression im Knochenmark bzw. peripheren Blutzellen von APL-Patienten nach ATRA-Therapie.

Die miR-181a- und miR-181b-Expression in RNA-Proben aus Knochenmark bzw. dem peripheralen Blut von 6 APL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose und zu einem Zeitpunkt während der ATRA-Therapie wurden mittels qPCR gemessen. Die Normalisierung erfolgte zur U6-Expression. ** $p \leq 0,01$.

3.1.4 Apoptose-induzierende Agenzien haben keinen Einfluss auf die miR-181a/miR-181b-Expression

Während der herkömmlichen ATRA-basierenden APL-Therapie werden zusätzlich die zytostatisch-wirkenden Medikamente Doxorubicin (Doxo), Cytarabin (ARA-C) und Arsentrioxid (As_2O_3) eingesetzt (260). Um den Einfluss dieser Medikamente auf die miR-181a- und miR-181b-Expression zu überprüfen, wurden NB4-Zellen einmalig mit $1 \mu M$ As_2O_3 , $0,01 \mu g/ml$ Doxorubicin in Kombination mit und ohne Cytarabin ($0,05 \mu mol/l$) behandelt. Als Kontrolle wurden die Zellen einmalig mit $1 \mu M$ ATRA

behandelt. Die jeweiligen Lösungsmittel wurden in den Kontrollansätzen in entsprechenden Volumina auf die Zellen appliziert. Die Analyse der miR-181a- und miR-181b-Expression 24h und 48h nach Behandlung zeigte, dass die verwendeten Zytostatika keine Repression der miR-181a- und miR-181b-Expression hervorriefen. Ferner konnte eine nicht signifikante Induktion der microRNA-Expression 48h nach Applikation der Agenzien nachgewiesen werden, welche auf mögliche apoptotische Effekte zurückgeführt werden kann. Dagegen zeigte sich in den ATRA-behandelten Zellen eine hoch signifikante Reduktion der miR-181a- und miR-181b-Expression (Abb. 10).

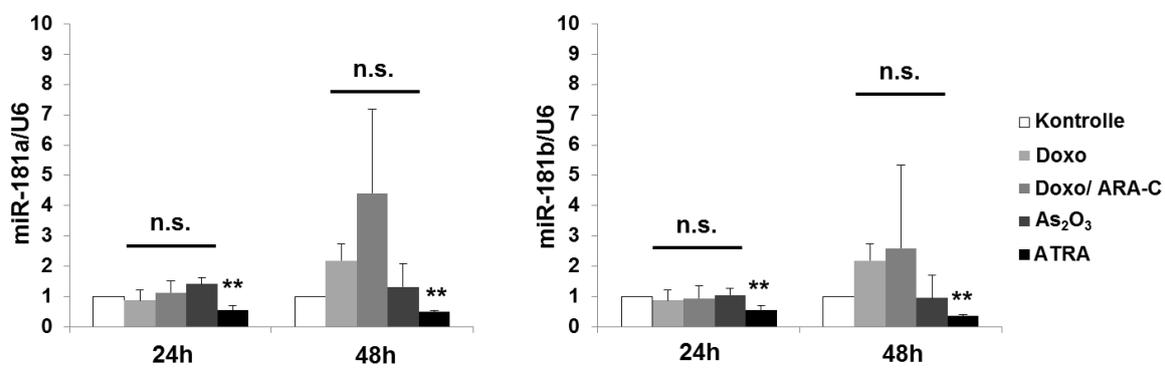


Abbildung 10 Keine Erniedrigung der miR-181a/miR-181b-Expression in NB4-Zellen nach Behandlung mit Zytostatika.

QPCR-Analyse der miR-181a- und miR-181b-Expression in NB4-Zellen 24h und 48h nach einmaliger Behandlung mit den Zytostatika Arsentrioxid (As₂O₃; 1µM) und Doxorubicin (Doxo; 0,01 µg/ml) in Kombination mit und ohne Cytarabin (ARA-C; 0,05 µmol/l) sowie nach ATRA-Behandlung (1µM). ** p ≤ 0,01; n.s.= nicht signifikant.

Um die Effekte der verwendeten Agenzien auf die Zellen zu überprüfen, wurde anhand eines Annexin V-basierenden Apoptose-Assays die Vitalität der Zellen 48h nach Behandlung überprüft. Dabei zeigte sich, dass die Behandlung mit ATRA keinen Einfluss auf die Apoptose hat. Hier ist der prozentuale Anteil der Annexin V+/ 7-AAD- -Zellen an der Gesamtzellzahl nach ATRA- bzw. DMSO-Behandlung gleich (Abb. 11 A). Die Behandlung der Zellen mit Zytostatika hingegen erhöht den Anteil der Annexin V+/ 7-AAD- -Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant. Zudem konnte auch eine deutliche Zunahme spätapoptotischer bzw. nekrotischer Zellen (Annexin V+/ 7-AAD+) beobachtet werden. Wobei die Kombination von Doxorubicin und

Cytarabin den Anteil Annexin V+/ 7-AAD+-Zellen noch zusätzlich erhöht (Abb. 11 B, C).

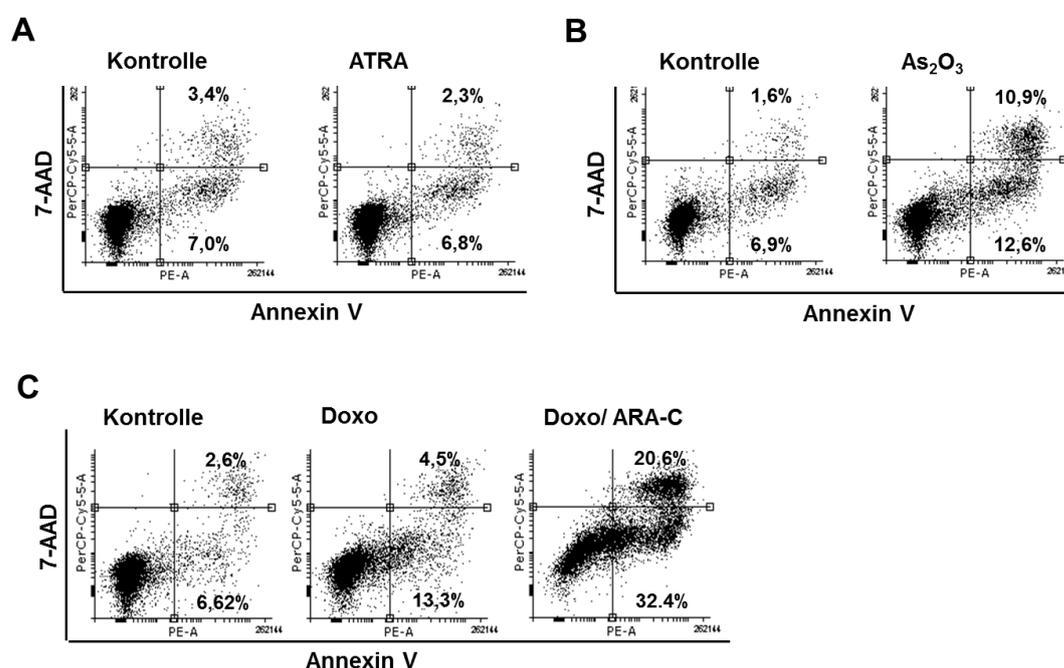


Abbildung 11 Zytostatika induzieren Apoptose in NB4-Zellen.

A-C FACS-basierender Nachweis Annexin V- und 7-AAD-positiver Zellen nach ATRA- (**A**), As₂O₃- (**B**), Doxorubicin- und Doxorubicin/Cytarabin-Behandlung (**C**) 48h nach Applikation. Die Prozentzahlen auf der rechten Seite kennzeichnen Annexin V-positive sowie Annexin V/ 7-AAD-doppeltpositive Zellen. Die Dot Blots zeigen ein repräsentatives Beispiel einer Messung. Die prozentualen Werte in den Quartanten entsprechen dem Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten.

Neben der Apoptose wurde auch der Differenzierungsstatus der Zellen durch die Messung der C/EBP β -mRNA-Menge mittels qPCR überprüft. Die Applikation von ATRA führte zu einer starken Induktion von C/EBP β nach 24h und 48h im Vergleich zur Kontrolle. Die Behandlung mit As₂O₃ und Doxorubicin in Kombination mit Cytarabin hingegen erzeugt nur nach 24h eine signifikante und im Vergleich zur ATRA-Behandlung deutlich schwächere Induktion der C/EBP β -Expression. Diese kann jedoch nach 48h nicht mehr nachgewiesen werden. Des Weiteren führt die Applikation von Doxorubicin alleine zu einer Repression von C/EBP β nach 48h (Abb. 12).

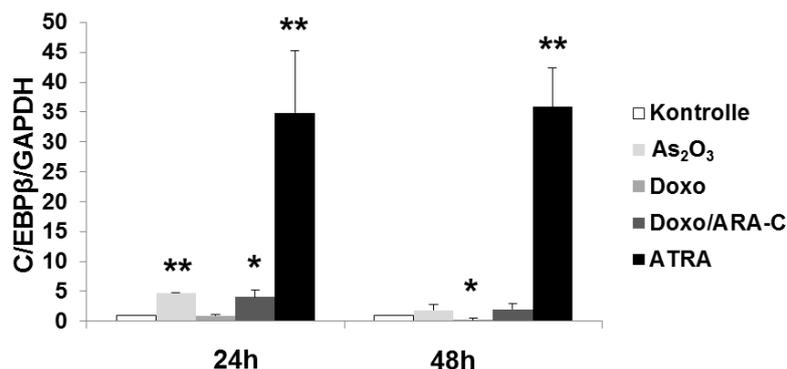


Abbildung 12 Zytostatika induzieren keine Differenzierung in NB4-Zellen.

Analyse der C/EBP β -Expression nach Applikation von As₂O₃, Doxorubicin in Kombination mit und ohne Cytarabin sowie ATRA mittels qPCR. Die Messung erfolgte 24h und 48h nach Behandlung. Normalisiert wurde zur Expression von GAPDH. * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$.

3.2 PML/RAR α induziert die miR-181a/miR-181b-Expression *in vitro* und *in vivo*

In der APL werden eine Vielzahl von Genen durch das onkogene Fusionsprotein PML/RAR α dereguliert (44), (43), (56), (46), (45). Die Behandlung von APL-Zellen mit pharmakologischen Dosen ATRA führt zur Degradation und zum Funktionsverlust des Fusionsproteins (59), (60) sowie zur Wiederherstellung der Differenzierung durch die Veränderung der Genexpression (259). Nachdem in den bisherigen Daten die ATRA-abhängige Repression des miR-181a/miR-181b-Cluster in APL-Zellen gezeigt wurde, sollte der Einfluss von PML/RAR α auf die miR-181a- und miR-181b-Expression untersucht werden.

3.2.1 Induktion der miR-181a/miR-181b-Expression in Abhängigkeit von PML/RAR α

Initial wurde eine vergleichende Analyse der miR-181a/miR-181b-Expression in der APL-Zelllinie NB4 und in der nicht-PML/RAR α -exprimierenden Zelllinie U937 durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Expression der beiden microRNAs in NB4-Zellen im Vergleich zu der in U937-Zellen signifikant erhöht ist (Abb. 13).

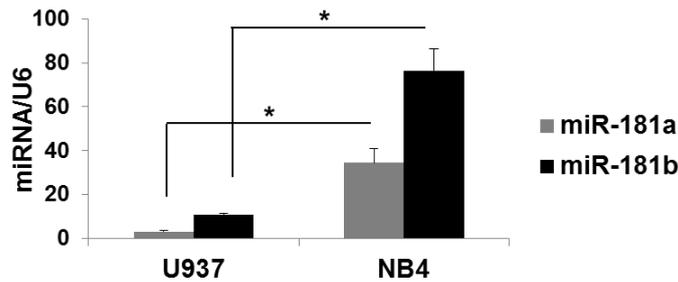


Abbildung 13 MiR-181a und miR-181b werden in NB4-Zellen verstärkt exprimiert.

Messung der miR-181a- und miR-181b-Expression in NB4- und U937-Zellen mittels qPCR. Die Normalisierung der Werte erfolgte anhand der U6-Expression. * $p \leq 0,05$.

In den folgenden Untersuchungen wurde als *in vitro*-Modell zur Analyse der PML/RAR α -Abhängigkeit der miR-181a- und miR-181b-Expression das myeloide Zelllinienmodell U937-PR9 genutzt. In diesen Zellen wird die PML/RAR α -cDNA unter der Kontrolle eines Metallothionein-Promotors exprimiert (257). Die entsprechenden Kontrollzellen (U937-PC18) tragen das leere Expressionskonstrukt. Die Induktion von PML/RAR α erfolgte durch einmalige Behandlung der Zellen mit 100 μ M ZnSO $_4$. Die Expression des Fusionsproteins wurde mittels Western Blot überprüft. Anhand der Detektion des Retinsäurerezeptor (RAR α) mittels Western Blot konnte in U937-PR9-Zellen neben dem endogen vorkommenden RAR α -Protein (55 kDa) auch das PML/RAR α -Fusionsprotein (130 kDa) nachgewiesen werden (Abb. 14 A), wohingegen in der Kontrollzelllinie U937-PC18 nur das endogene RAR α -Protein detektierbar war (Abb. 14 B). Die Analyse der miR-181a- und miR-181b-Expression erfolgte mittels qPCR und zeigte eine bereits nach 2h signifikant erhöhte microRNA-Menge in U937-PR9-Zellen, welche über den Analysezeitraum von 6h geringfügig abnahm (Abb. 14 C). In den Kontrollzellen U937-PC18 konnte keine veränderte miR-181a- und miR-181b-Expression infolge der ZnSO $_4$ -Applikation festgestellt werden (Abb. 14 D).

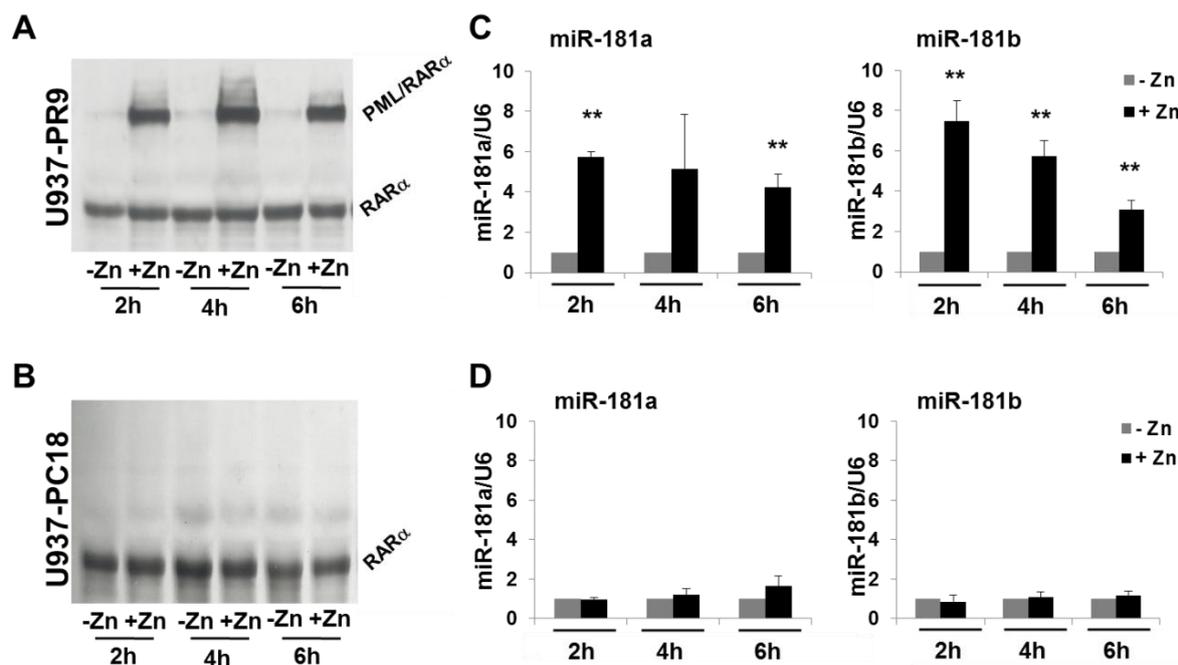


Abbildung 14 PML/RAR α induziert das miR-181a/miR-181b-Cluster.

A und **B** Western Blot für PML/RAR α und RAR α in U937-PR9-Zellen (**A**) und in U937-PC18-Zellen (**B**) nach Zinksulfat (ZnSo₄)-Applikation. **C** und **D** Analyse der miR-181a- und miR-181b-Expression in U937-PR9-Zellen (**C**) und U937-PC18-Zellen (**D**) mittels qPCR. Die qPCR-Normalisierung erfolgte anhand der U6-Expression. * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$.

3.2.2 Verstärkte Expression des miR-181a/miR-181b-Clusters in APL-Patienten und PML/RAR α -knock *in*-Mäusen

Für die *in vivo*-Analysen der PML/RAR α -Abhängigkeit der miR-181a- und miR-181b-Expression wurden Knochenmarksproben von AML-Patienten und Blutzellproben von nicht-AML-Patienten (gesunde Blutzellen) sowie ein PML/RAR α -knock *in*-Mausmodell genutzt (siehe 2.1.5., Tabelle 4). Im untersuchten PML/RAR α -knock *in*-Mausmodell wird das humane PML/RAR α -Gen unter der Kontrolle des murinen Cathepsin G-Gens exprimiert, was eine gewebsspezifische Expression des Fusionsproteins in hämatopoetischen Vorläuferzellen ermöglicht. Die Analyse der miR-181a- und miR-181b-Expression mittels qPCR zeigt eine signifikant erhöhte Menge der beiden microRNAs in Abhängigkeit von PML/RAR α (Abb. 15 A). Des Weiteren ergab die Untersuchung verschiedener AML-Patientenproben eine signifikant erhöhte Expression von miR-181a und miR-181b in Patienten, welche das PML/RAR α -Fusionsprotein tragen [t(15;17)]. Der Vergleich der Expressionswerte

erfolgte zu AML-Patienten mit normalem Karyotyp. Die Zellproben der anderen untersuchten Subgruppen sowie gesunde Blutzellen wiesen keine signifikant veränderte miR-181a- und miR-181b-Expression auf. Nur Patienten mit dem onkogenen AML1/ETO-Fusionsprotein (t[8;21]) zeigten eine leicht erhöhte jedoch nicht signifikante miR-181a- und miR-181b-Expression (Abb. 15 B).

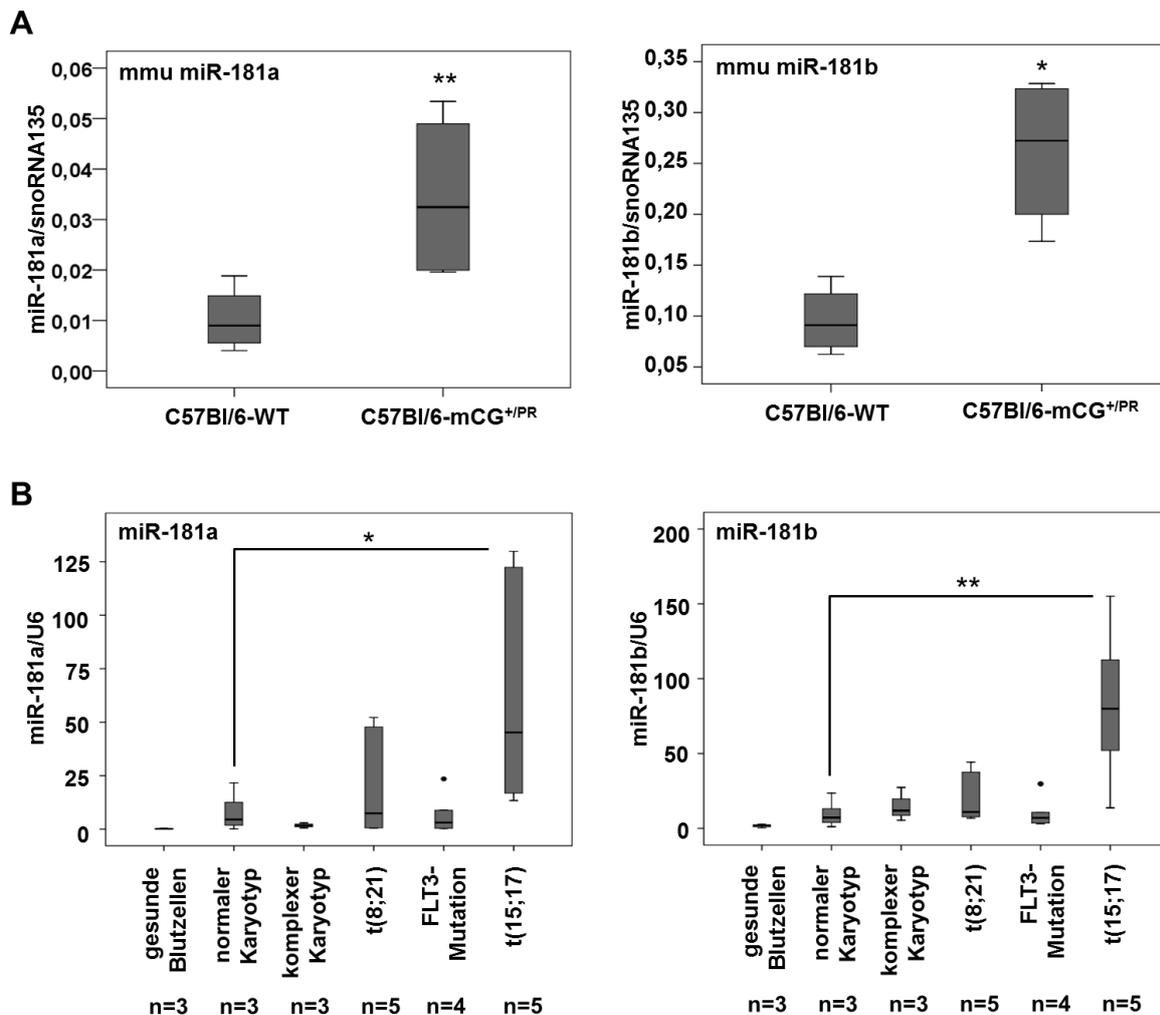


Abbildung 15 In APL-Patienten und in PML/RAR α -*knock in*-Mäusen wird das miR-181a/miR-181b-Cluster verstärkt exprimiert.

A Analyse der miR-181a- und miR-181b-Expression im Knochenmark von 5 PML/RAR α -*knock in*-Mäusen (C57Bl/6-mCG^{+PR}) und 5 Wildtyp-Mäusen (C57Bl/6-WT) mittels qPCR. **B** Analyse der miR-181a- und miR-181b-Expression in gesunden Blutzellen von nicht-AML-Patienten und in Knochenmarkszellproben von AML-Patienten, unterteilt in spezifische Subgruppen mit entsprechenden Charakteristika. In den Box-Whisker-Plots sind die ddCt-Werte dargestellt. In den Mausproben wurde anhand der Expression der murinen snoRNA135 und in den humanen Proben anhand der U6-Expression normalisiert. * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$.

3.3 Das miR-181a/miR-181b-Cluster ist essentiell für die Aufrechterhaltung der APL

Im Anschluss an die deskriptiven Untersuchungen zur APL-spezifischen Expression des miR-181a/miR-181b-Clusters, sollte den beiden microRNAs eine biologische Relevanz in der APL mittels *knock down*- und Überexpressionsexperimenten zugewiesen werden.

3.3.1 Blockierung des miR-181a/miR-181b-Clusters induziert Apoptose in NB4-Zellen

Die Repression der miR-181a- und miR-181b-Expression wurde in NB4-Zellen mittels lentiviraler Transduktion spezifischer miR-ZIP-Konstrukte (siehe 2.1.4. Vektoren und Oligos) erzeugt. Bei dem miR-ZIP-basierenden microRNA-*knock down* werden asymmetrische shRNA-Moleküle erzeugt, welche zu sequenzspezifischen *antisense*-Oligos mit 100%-iger Komplementarität zur Ziel-microRNA prozessiert werden. Für den *knock down* der miR-181a und miR-181b wurden spezifische lentivirale Vektoren (System Bioscience), welche einen Einzel- bzw. Simultan-*knock down* der microRNAs erzeugen, genutzt. Das verwendete Kontrollkonstrukt kodiert eine unspezifische Sequenz.

Die Selektion miR-ZIP-exprimierender Zellen erfolgte durch FACS-basierendes Zellsortierung und die Behandlung mit dem Antibiotikum Puromycin. In den selektierten Zellen wurde anschließend die miR-181a- und miR-181b-Expression mittels qPCR bestimmt. Die Ergebnisse zeigten eine bis zu 60%-ige Reduktion der miR-181a-Menge nach Expression miR-181a-spezifischer *antisense*-Moleküle. Die Expression miR-181b-spezifischer *antisense*-Moleküle erzeugte eine bis zu 50%-ige Reduktion der miR-181b-Menge. Zudem zeigte sich, dass beide Moleküle auch die jeweils andere microRNA in einem geringeren Maße reprimieren. Des Weiteren wurde auch ein Simultan-*knock down* beider microRNAs durch Expression der beiden *antisense*-Moleküle unter der Kontrolle eines Promotors durchgeführt. Dabei konnte jedoch keine gesteigerte *knock down*-Effizienz beobachtet werden (Abb. 16).

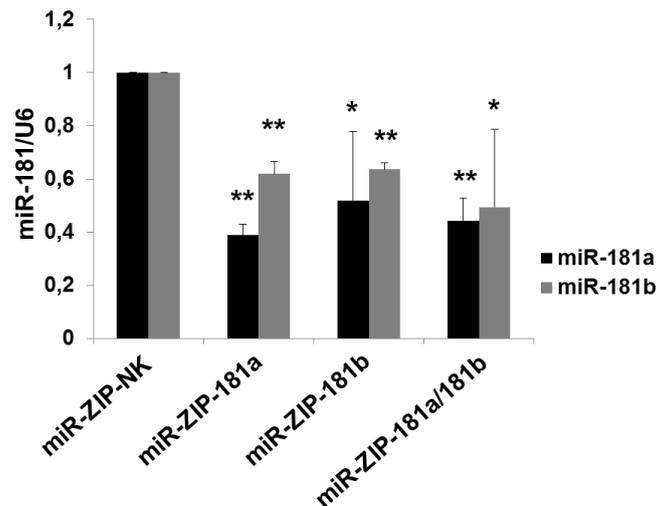


Abbildung 16 Stabile Expression von miR-181a- und miR-181b-antisense-Molekülen führt zur Reduktion der miR-181a- und miR-181b-Menge.

Analyse der miR-181a- und miR-181b-Mengen in NB4-Zellen mittels qPCR nach lentiviraler Infektion der Zellen mit miR-ZIP-Konstrukten (miR-ZIP-NK; miR-ZIP-181a; miR-ZIP-181b; miR-ZIP-181a/181b). Die Normalisierung erfolgte zur Expression der U6 * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$.

Aufgrund der mangelnden Effizienzsteigerung durch den Simultan-*knock down* wurden in den anschließenden Experimenten die miR-ZIP-181a/181b-exprimierenden Zellen nicht weiter berücksichtigt. Der Einfluss des miR-ZIP-vermittelten microRNA *knock downs* auf die Vitalität der Zellen wurde einerseits durch die Messung der Proteinmenge des Zellzyklus- und Apoptoseregulators p53 sowie durch die Messung Annexin V-positiver Zellen untersucht. Im Western Blot für p53 zeigte sich eine 2,1-fache Induktion des Proteins nach Inhibierung von miR-181a. Der *knock down* von miR-181b erzeugte lediglich eine Erhöhung des p53-Proteins auf die 1,2-fache Menge (Abb.17 A). Die Analyse apoptotischer Zellen erfolgte anhand eines Annexin V-Apoptose-Assays. Hierfür wurde der Anteil Annexin V-positiver Zellen mittels FACS bestimmt. Der Ausschluss von spätapoptotischen und nekrotischen Zellen erfolgte über die Messung von 7-AAD. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme Annexin V+/7-AAD- Zellen nach *knock down* von miR-181a bzw. miR-181b im Vergleich zu den Kontrollzellen. Dabei konnte in den miR-ZIP-181a-exprimierenden Zellen eine Erhöhung der Apoptoserate um mehr als 100% beobachtet werden, wohingegen miR-ZIP-181b-exprimierende Zellen lediglich eine Steigerung der Apoptoserate von ca. 50% aufwiesen (Abb. 17 B).

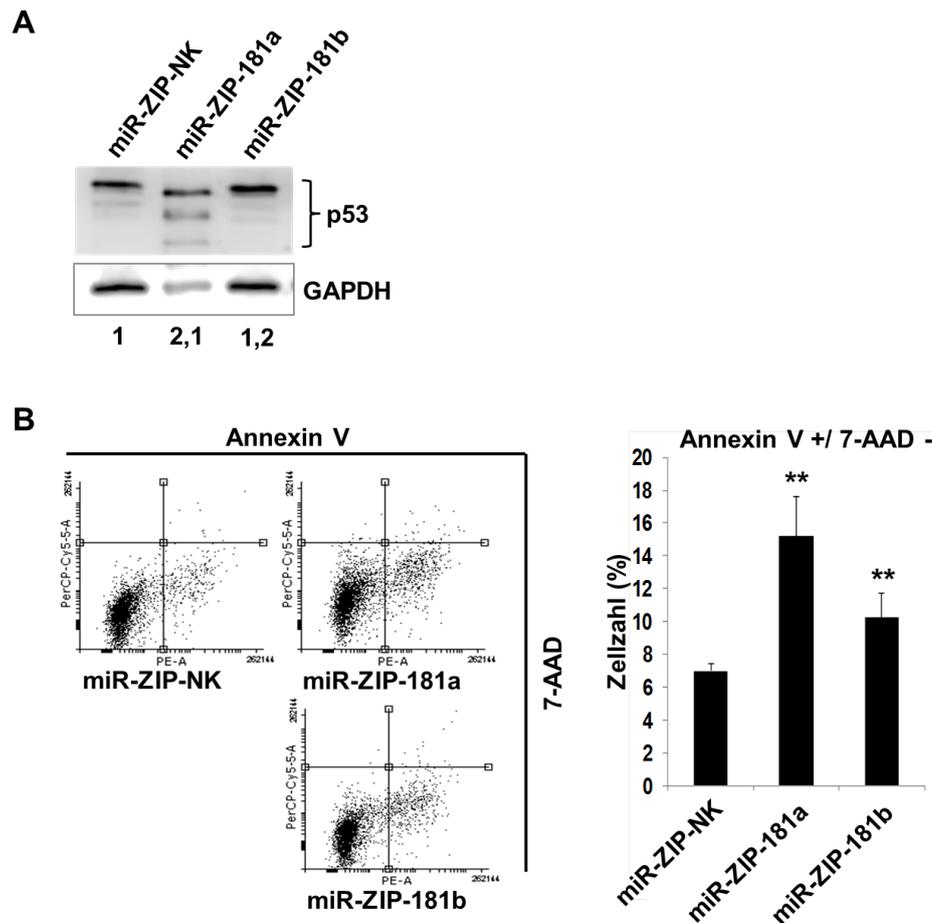


Abbildung 17 Stabile Inhibierung von miR-181a und miR-181b induziert Apoptose in NB4-Zellen.

A Western Blot für das p53-Protein in miR-ZIP-exprimierenden NB4-Zellen. Die Werte unterhalb des Western Blots korrespondieren zu den entsprechenden Ratios aus p53 und GAPDH. **B** Apoptose-Assay von miR-ZIP-exprimierender Zellen. Nachweis apoptotischer Zellen nach Annexin V/ 7-AAD-Färbung mittels FACS. Die Dot Blots zeigen ein repräsentatives Beispiel einer Messung. Das Balkendiagramm (rechts) repräsentiert den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten und stellt den prozentualen Anteil Annexin V+/ 7 AAD- -Zellen dar. ** $p \leq 0,01$.

3.3.2 Blockierung des miR-181a/miR-181b-Clusters in NB4-Zellen inhibiert die Fähigkeit zur Koloniebildung

Ein Charakteristikum von hämatopoetischen Zellen ist die Fähigkeit zur Koloniebildung in einer semisoliden Matrix. Dabei lässt sich die Fähigkeit zum *self-renewal* in einem seriellen *replating*-Assay (siehe 2.2.8.) untersuchen. Im *replating*-Assay miR-ZIP-exprimierender NB4-Zellen zeigte sich, dass es durch den *knock*

down von miR-181a und miR-181b zu einer verminderten Koloniebildungsfähigkeit im Vergleich zur Kontrolle kommt. Dabei wurden in der ersten Aussaat infolge der miR-181a-Inhibierung ca. 90% weniger Kolonien und infolge der miR-181b-Inhibierung ca. 30% weniger Kolonien im Vergleich zur Kontrolle gebildet. Die Koloniezahl der Kontrollzellen nahm während der folgenden 2 *replating*-Runden kontinuierlich zu. Auch die Zellzahl der miR-ZIP-181a-exprimierenden Zellen stieg in den folgenden Plattierungsrunden wieder leicht an, wohingegen die Koloniezahlen der miR-ZIP-181b-exprimierenden Zellen im Laufe des Assays kontinuierlich abnahmen (Abb. 18).

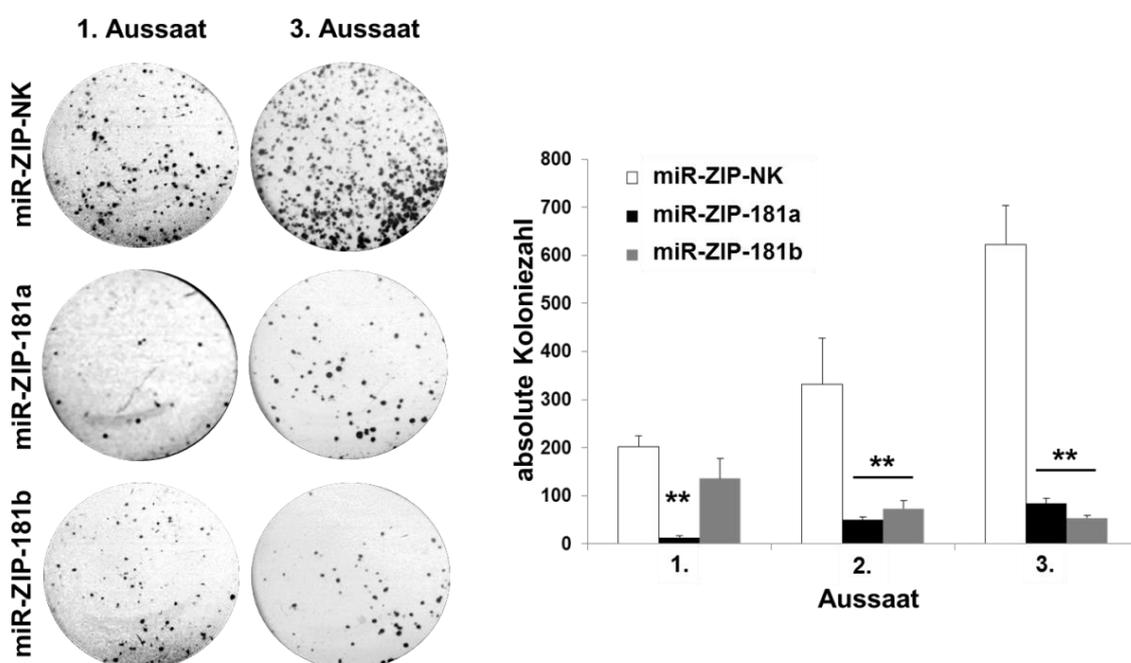


Abbildung 18 Verminderte Koloniezahl nach Inhibierung des miR-181a/miR-181b-Clusters.

Replating Assay miR-ZIP-exprimierender NB4-Zellen. Fotografische Darstellung der Kolonieverteilung nach der 1. und der 3. Aussaat. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel für jeden Ansatz. Im Balkendiagramm (rechts) sind die Mittelwerte 3 unabhängiger Wiederholungen des *replating*-Assays zu jeder Aussaat dargestellt. ** $p \leq 0,01$.

Zusätzlich wurde die Koloniegröße der miR-ZIP-exprimierenden Zellen und der Kontrollzellen bestimmt. Hierfür wurden 135 zufällig ausgewählte Kolonien nach der ersten Aussaat mit Hilfe des Programms Image G ausgemessen. Die Analyse zeigte eine verminderte durchschnittliche Koloniegröße der miR-ZIP-181a- und miR-ZIP-181b-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 19).

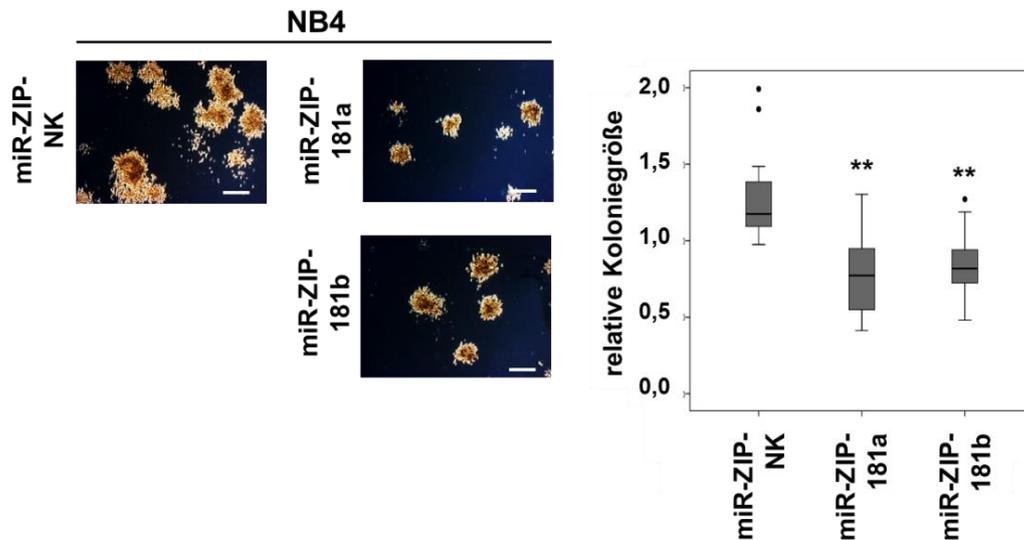


Abbildung 19 Nach stabiler Inhibierung von miR-181a und miR-181b ist die NB4-Koloniegröße reduziert.

Koloniegrößenmessung von miR-ZIP-exprimierenden NB4-Zellen im CFU-Assay an Tag 6 der 1. Aussaat. Der weiße Balken unten rechts im Foto entspricht einer Länge 300 μm . Im Box-Whisker-Plot (rechts) sind die Mittelwerte der Koloniegrößenbestimmung aus 3 unabhängigen Wiederholungen des CFU-Assays dargestellt. ** $p \leq 0,01$.

3.3.3 Reduziertes Wachstum von NB4-Zellen infolge der Inhibierung von miR-181a und miR-181b

Neben Apoptose und der Fähigkeit zur Koloniebildung wurde auch die Proliferationsfähigkeit miR-ZIP-exprimierender NB4-Zellen untersucht. Nach der Aussaat von jeweils 1×10^4 Zellen/ml wurde die Lebendzellzahl über einen Zeitraum von 9 Tagen in einem 3-tägigen Rhythmus mittels Auszählung Trypanblau-gefärbter Zellen bestimmt. Die Resultate zeigten einen kontinuierlichen Anstieg der Zellzahl über den Beobachtungszeitraum in allen untersuchten Konditionen. Dabei wiesen miR-ZIP-181a- und miR-ZIP-181b-exprimierende Zellen nach 9-Tagen eine im Mittel um 78% (miR-ZIP-181a) und 85% (miR-ZIP-181b) reduzierte Zellzahl gegenüber den Kontrollzellen auf (Abb. 20).

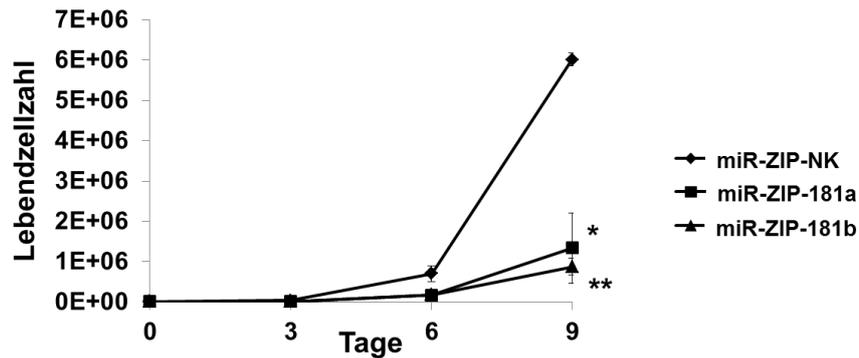


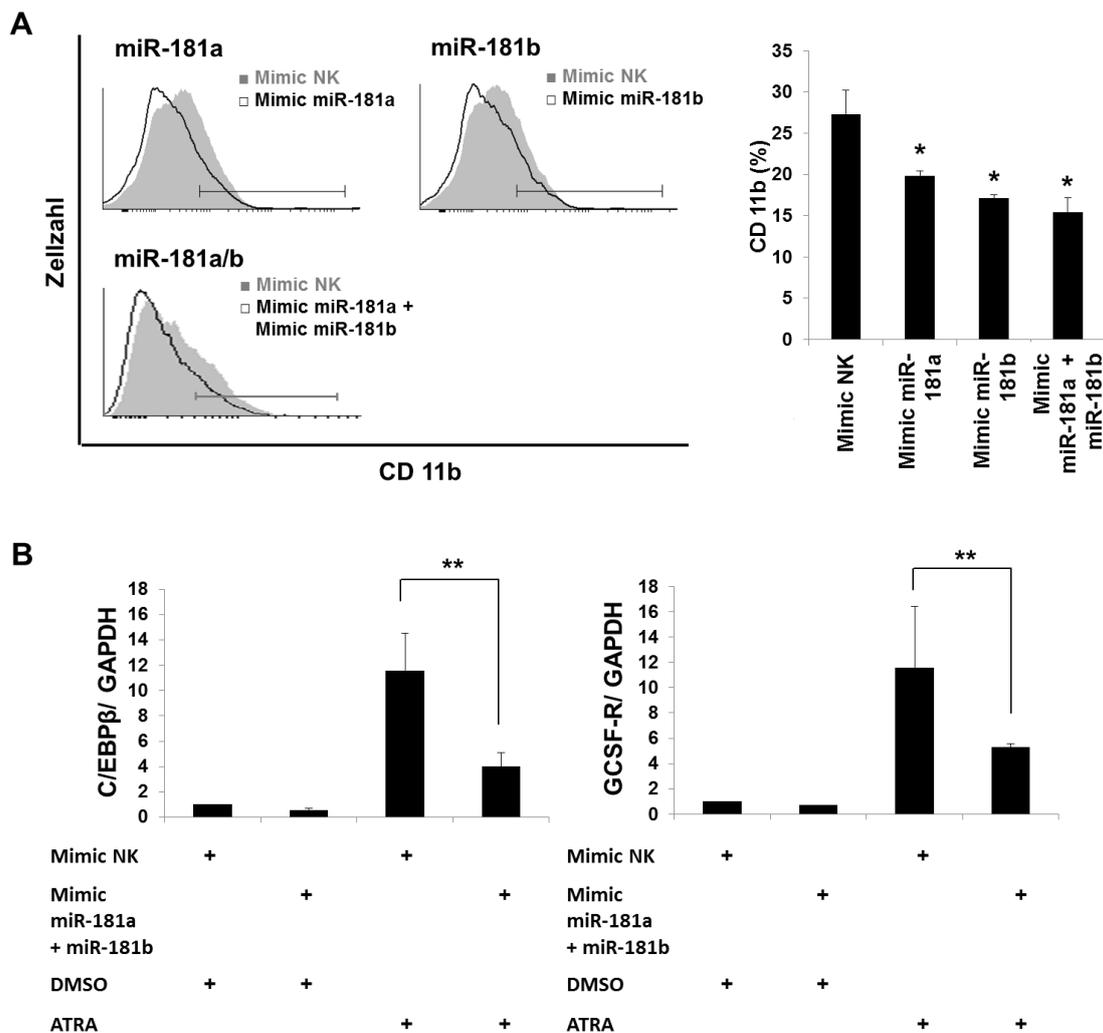
Abbildung 20 Verminderte Proliferationsfähigkeit der NB4-Zellen nach stabiler Inhibierung von miR-181a und miR-181b.

Zellwachstumskurve miR-ZIP-exprimierender NB4-Zellen über einen Zeitraum von 9 Tagen. Im 3-tägigen Abstand wurde die Lebendzellzahl mikroskopisch mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. ** $p \leq 0,01$.

3.3.4 Intrazelluläre miR-181a- und miR-181b- Anreicherung inhibiert die ATRA-induzierte Differenzierung von NB4-Zellen

In den bisherigen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit ATRA zur signifikanten und stabilen Reduktion der miR-181a- und miR-181b-Expression in APL-Zellen führt. Um die funktionelle Relevanz dieses Prozesses während der ATRA-abhängigen granulozytären Differenzierung von NB4-Zellen zu untersuchen, wurden die intrazellulären miR-181a- und miR-181b-Mengen durch die Transfektion spezifischer Mimic-Moleküle artifiziell erhöht. Mit Hilfe von Mimic-Molekülen ist es möglich spezifische microRNAs funktionell zu mimikrieren. 24h nach Transfektion erfolgte die Applikation von ATRA. Die FACS-basierende CD11b-Messung zeigte eine signifikant reduzierte Menge des granulozytären Oberflächenmarkers in den miR-181a- und miR-181b-Mimic-transfizierten Zellen gegenüber den Kontrollzellen, welche mit unspezifischen Mimic-Molekülen transfiziert wurden. Im Detail war der Anteil an CD11b-Molekülen nach Transfektion von miR-181a-Mimic-Molekülen um 25% und nach Transfektion von miR-181b-Mimic-Molekülen um 37% im Vergleich zur Kontrolltransfektion reduziert. Die simultane Transfektion beider Mimic-Moleküle resultierte in einer um 45% verminderten CD11b-Expression im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 21 A). Neben dem granulozytären Oberflächenmarker CD11b wurde auch die mRNA-Menge von C/EBP β und GCSF-R, welche im Laufe der ATRA-induzierten Differenzierung

verstärkt transkribiert werden, bestimmt. 48h nach Kotransfektion von miR-181a- und miR-181b-Mimics konnte in der qPCR-basierenden Analyse eine signifikante Reduktion der C/EBP β - und GCSF-R-mRNA-Menge beobachtet werden. Dabei wurde die Expression von C/EBP β um 67% und die Expression von GCSF-R um 58% im Vergleich zur Kontrolltransfektion gemindert (Abb. 21 B).



Abbildungung 21 Transiente Überexpression von miR-181a und miR-181b inhibiert die ATRA-abhängige Differenzierung von NB4-Zellen.

A und **B** Transfektion von NB4-Zellen mit microRNA Mimic-Molekülen für miR-181a und miR-181b sowie einer unspezifischen Kontrolle (NK). Die Applikation von ATRA (0,1 μ M) sowie der entsprechenden Menge DMSO erfolgte 24h nach Transfektion. **A** Analyse der CD11b-Expression mittels FACS 48h nach Transfektion der Mimic-Moleküle. Die Resultate wurden jeweils als Überlagerungshistogramm der Kontroll-Mimic-Transfektion (Mimic NK) und der jeweiligen microRNA Mimic-Transfektion dargestellt. Das Balkendiagramm (rechts) zeigt den prozentualen Anteil CD11b-exprimierender Zellen an der Gesamtzellzahl in der jeweiligen Bedingung. **B** C/EBP β - und GCSF-R-mRNA-Messung mittels qPCR in NB4-Zellen 48h nach Transfektion der Mimic-Moleküle. Die Normalisierung der PCR erfolgt zu GAPDH. * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$.

3.4 Der Tumorsuppressor RASSF1A ist ein direktes Ziel von miR-181a und miR-181b

In den bisherigen Resultaten wurde die funktionelle Relevanz von miR-181a und miR-181b in der PML/RAR α -assoziierten APL untersucht. MicroRNAs vermitteln im Allgemeinen ihre Funktion über die direkte Bindung an mRNA-Ziele und deren Translationsrepression (261). Aus diesem Grund wurde mit Hilfe des *online*-verfügbaren Dienstprogramms TargetScan (<http://targetscan.org>) nach putativen Ziel-mRNAs gesucht. Der 2003 entwickelte bioinformatische Algorithmus TargetScan sagt auf Grundlage von Sequenzkomplementarität, Berechnung der freien Energie bei RNA-Duplex-Bildung und der phylogenetischen Konservierung zwischen Vertebraten potentielle microRNA-mRNA-Interaktionen voraus (262). Bei der Analyse wurde die Liste putativer Ziele nach dem *total context score+* sortiert. Dabei ergibt sich der *total context score+* aus der Summe definierter Eigenschaften der Bindestelle (263). Die Selektion möglicher Ziel-mRNAs erfolgte zusätzlich anhand der Anzahl und Konservierung der Bindestellen in der 3'UTR sowie der bereits bekannten biologischen Funktion des Proteins.

3.4.1 Identifikation putativer miR-181-Bindestellen in der 3'UTR des Tumorsuppressors RASSF1A

Die miR-181-Familienmitglieder sind durch eine identische *seed*-Sequenz charakterisiert. TargetScan 7.0 (264) listet für die miR-181-Familie 1194 putative Ziel-Transkripte mit 1412 konservierten und 626 schwach konservierten Bindestellen. Deren Charakterisierung erfolgte auf der Grundlage einer Publikation von Friedman et al. (265). Unter den Top-20% der Transkripte, sortiert nach ihrem *total context score+*, befindet sich der Tumorsuppressor Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1 (RASSF1A). Dessen 3'UTR besitzt 3 putative miR-181-Bindestellen, eine in Vertebraten hoch konservierte [1] und 2 schwach konservierte [2;3], (Abb. 22 A, B). In der RASSF1A 3'UTR besitzt nur die miR-181-Familie eine in allen Vertebraten konservierte Bindestelle (Abb.22 C). RASSF1A ist ein in einer Vielzahl solider Tumore gut charakterisierter Tumorsuppressor (245), dem bisher

noch keine Funktion in der Hämatopoese und der AML zugewiesen werden konnte. Aufgrund des Vorkommens von 3 miR-181-Bindestellen und der Tatsache, dass RASSF1A bisher nicht in der AML bzw. APL funktionell beschrieben wurde, wurden weitere Analysen bezüglich einer miR-181-RASSF1A-Interaktion in der APL vorgenommen.

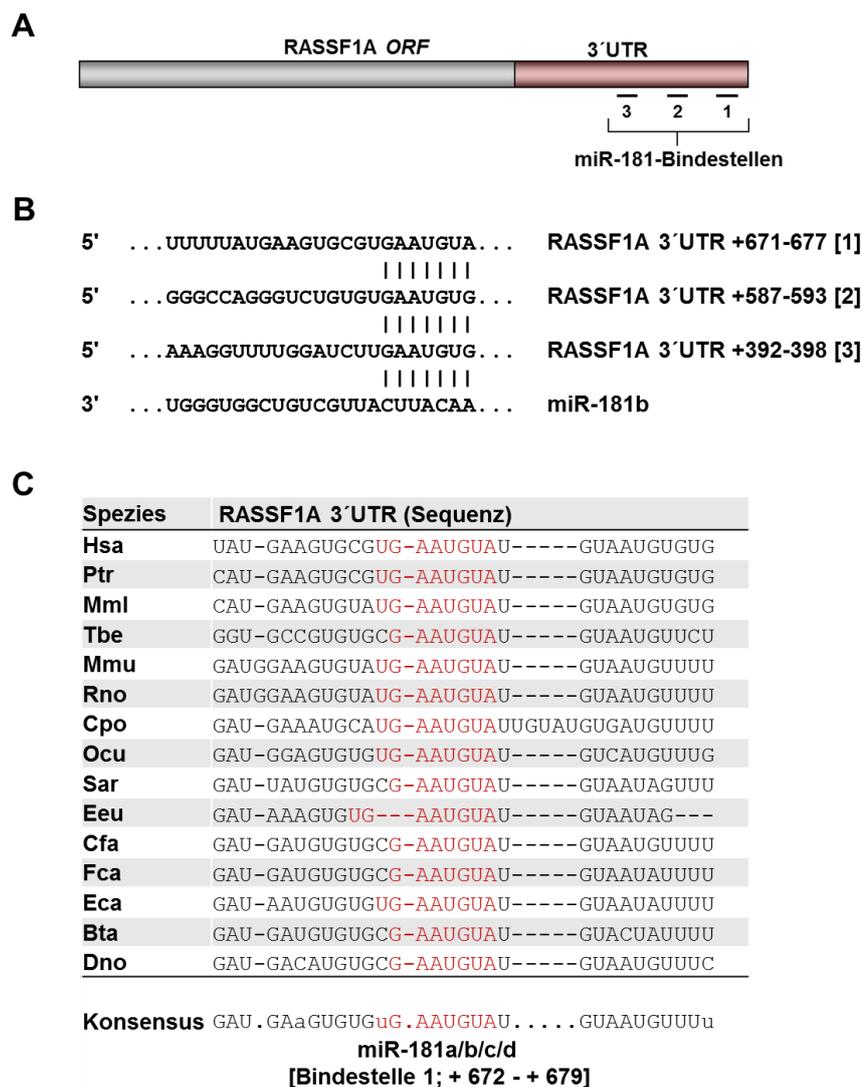


Abbildung 22 Basenkomplementaritäten zwischen RASSF1A 3'UTR und miR-181-Familie.

A Schematische Darstellung der RASSF1A-mRNA und Kennzeichnung der 3 putativen miR-181-Bindestellen in der 3'UTR. **B** Detaillierte Darstellung der komplementären Sequenzbereiche zwischen miR-181-Familie und der RASSF1A 3'UTR. In der RASSF1A 3'UTR befinden sich 3 putative miR-181-Bindestellen. [1] = hoch konserviert; [2] und [3] = schwach konserviert. Die *seed*-Sequenz ist durch vertikale Striche gekennzeichnet. Die Zahlenwerte kennzeichnen die Nukleotide relative zum Terminationskodon des humanen *RASSF1A*-Gens. **C** Darstellung der in Vertebraten hochkonservierten miR-181-Bindestelle [1] mit Auflistung verschiedener Mammalia mit den entsprechenden RASSF1A 3'UTR-Sequenzabschnitten. Kennzeichnung der *seed*-Sequenz in Rot.

3.4.2 Das miR-181a/miR-181b-Cluster reguliert die RASSF1A Proteinmenge

Zunächst wurde ein Nachweis des RASSF1A-Proteins in verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien und humanen CD34+-Progenitorzellen durchgeführt. Im Western Blot zeigte sich, dass das RASSF1A-Protein in allen analysierten Zellen in unterschiedlichen Mengen nachweisbar war. Die geringsten Proteinmengen wurden in HL60-Zellen und in der APL-Zelllinie NB4 detektiert. U937- und K562-Zellen wiesen ähnlich starke RASSF1A-Proteinmengen wie CD34+-Zellen, welche als Referenzzellen dienen, auf (Abb. 23).

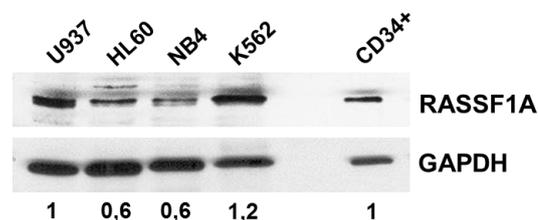


Abbildung 23 Analyse der RASSF1A-Proteinmenge in verschiedenen AML-Zelllinienmodellen und humanen CD34+ Progenitorzellen.

Nachweis des RASSF1A-Proteins in U937-, HL60-, NB4-, K562-Zellen sowie CD34+-Progenitorzellen mittels Western Blot. Als Referenz wurden CD34+-Progenitorzellen genutzt. Die Normalisierung erfolgte durch GAPDH. Die Zahlenwerte unter dem Western Blot korrespondieren zu den entsprechenden Ratios aus RASSF1A und GAPDH.

Ein möglicher miR-181a- und miR-181b-vermittelter Effekt auf die RASSF1A-Proteinmenge wurde nach Transfektion von miR-181a- und miR-181b-spezifischen Mimic-Molekülen in U937-Zellen sowie in miR-ZIP-181a- und miR-ZIP-181b-exprimierenden NB4-Zellen untersucht. Die Analyse mittels Western Blot zeigte eine über den Messzeitraum von 48h starke Abnahme der RASSF1A-Proteinmenge nach miR-181a- bzw. miR-181b-Mimic-Transfektion im Vergleich zur Kontrolltransfektion mit unspezifischen Mimic-Molekülen. Dabei führen miR-181b-Mimic-Moleküle zu einer 100%-igen und miR-181a-Mimic-Moleküle zu einer 70%-igen Repression des Proteins nach 48h (Abb. 24 A). Die Analyse der RASSF1A-Proteinmenge in miR-ZIP-exprimierenden Zellen mittels Western Blot zeigte eine Erhöhung des Proteins um 80% nach stabilem *knock down* von miR-181a und um 70% nach stabilem *knock down* von miR-181b (Abb. 24 B).

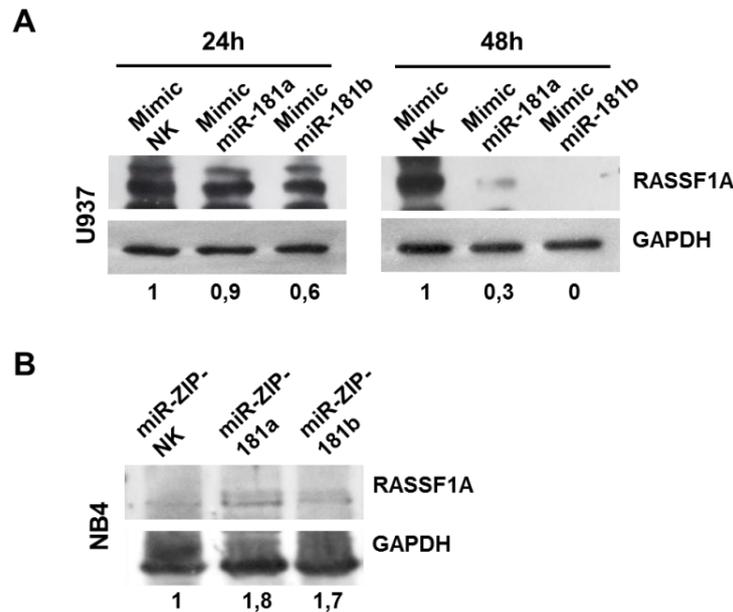


Abbildung 24 Das miR-181a- und miR-181b-Level beeinflusst die RASSF1A-Proteinmenge.

A und **B** Analyse der RASSF1A-Proteinmenge mittels Western Blot 24h und 48h nach Transfektion von miR-181a und miR-181b Mimic-Molekülen sowie der Kontroll-Mimics in U937-Zellen (**A**) und in NB4-Zellen nach lentiviraler Inhibierung von miR-181a und miR-181b (**B**). Die Normalisierung erfolgte durch GAPDH. Die Zahlenwerte unter den Western Blots korrespondieren zu den entsprechenden Ratios aus RASSF1A und GAPDH.

3.4.3 Direkte Bindung von miR-181a und miR-181b an die RASSF1A 3'UTR

Der Nachweis der direkten Bindung von miR-181a und miR-181b an die 3'UTR von RASSF1A erfolgte mittels eines modifizierten Luciferase-Assays. Dabei handelt es sich um eine klassische Methode zum Nachweis einer direkten microRNA-mRNA-Interaktion. Die zu untersuchende 3'UTR wird dafür hinter das Luciferasegen inseriert. Durch die Bindung der microRNA an die entsprechenden Bindestellen in der 3'UTR kommt es zum Abbruch der Translation der Luciferase-mRNA und somit zur Reduktion der Luciferaseaktivität (266). Die Mutation der microRNA-Bindestellen wiederum ruft die Wiederherstellung der Translation und somit die Erhöhung der Luciferaseaktivität hervor. Dadurch erfolgt der spezifische Nachweis der microRNA-Bindung an die 3'UTR der Ziel-mRNA. Zur Herstellung des Luciferasekonstruktes wurde die komplette RASSF1A 3'UTR in die *Xba*I-Schnittstelle des pGL3-Kontrollvektors inseriert (siehe 2.2.16). Diese befindet sich zwischen Luciferase-Gen und Poly-A-Sequenz (Abb. 25 A). Mittels *in vitro*-Mutagenese der 3 miR-181-Bindestellen wurden 3 bis 4 Basen in der *seed*-Sequenz der jeweiligen Bindestelle

ausgetauscht und somit die miR-181a/miR-181b-Bindestellen zerstört (siehe 2.2.17; Abb. 25 B).

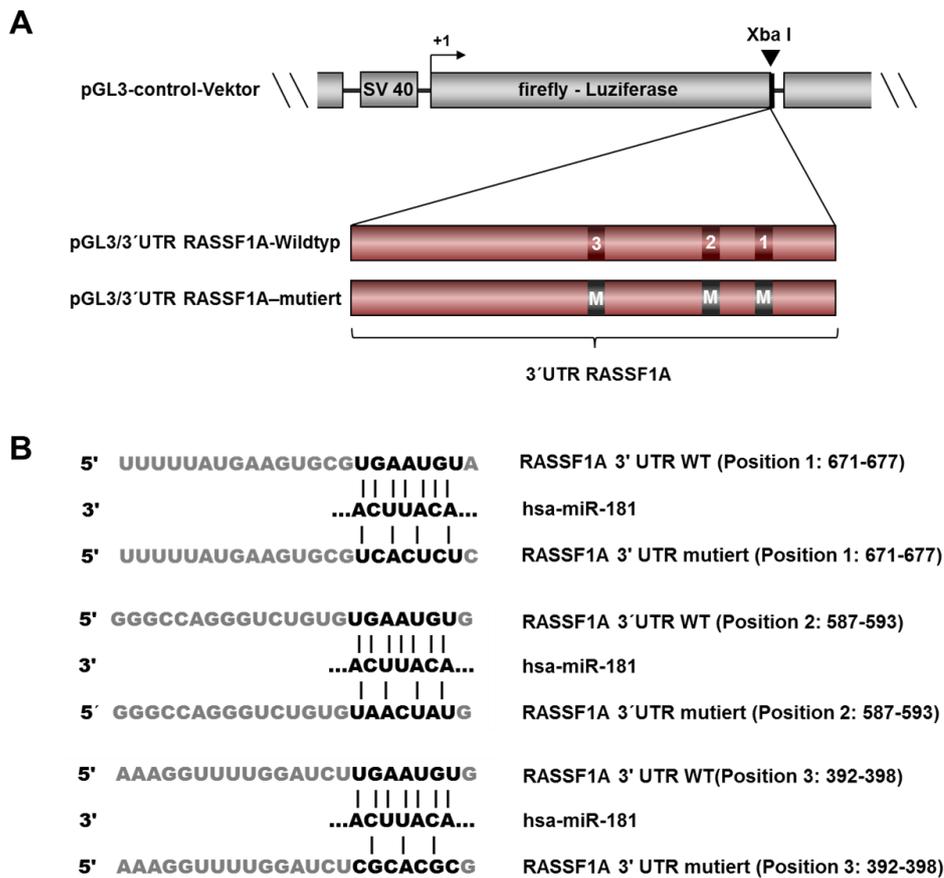


Abbildung 25 Luziferasekonstrukte mit originären und mutierten Sequenzen der miR-181-Bindestellen. **A** Schematische Darstellung eines Teils des pGL3-Luziferase-Konstruktes mit der XbaI-Restriktionsschnittstelle, in welche die RASSF1A 3'UTR eingebracht wurde. Im Konstrukt pGL3/3'UTR RASSF1A 3'UTR-Wildtyp sind die miR-181-Bindestellen durch die Zahlen 1-3 gekennzeichnet. Mit pGL3/3'UTR RASSF1A 3'UTR-mutiert ist das Konstrukt, welches die mutierten Bindestellen (M) trägt, gekennzeichnet. **B** Schematische Präsentation der vorhergesagten sowie mutierten miR-181-Bindestellen in der RASSF1A-3'UTR. Die Zahlenwerte in Klammern geben den Abstand der Nukleotide relativ zum Terminationskodon des humanen RASSF1A an.

Die zwei Luziferasekonstrukte (pGL3-3'UTR RASSF1A-Wildtyp und pGL3-3'UTR RASSF1A-mutiert) wurden jeweils in Kombination mit miR-181a-, miR-181b- bzw. Kontroll-Mimic-Molekülen sowie einem Renilla Luciferase Reportervektor (pRL0) in U937-Zellen mittels Elektroporation eingebracht. U937-Zellen wurden aufgrund ihrer geringen miR-181a- und miR-181b-Expression als Modellsystem zur Durchführung des Luziferase-Assays genutzt (Abb. 13). 24h nach Transfektion wurde die Luziferase-Aktivität in den Zellen luminometrisch bestimmt. Die Ergebnisse zeigten

eine microRNA-Mimic-vermittelte Reduktion um ca. 60% (miR-181a) bzw. 50% (miR-181b). Dieser Effekt konnte durch die Mutation der Bindestellen aufgehoben werden (Abb. 26). Die Berechnung der Luziferase-Aktivität nach miR-181a- bzw. miR-181b-Mimic-Transfektion erfolgte relativ zu der Luziferase-Aktivität nach Kontroll-Mimic-Transfektion (Mimic-NK).

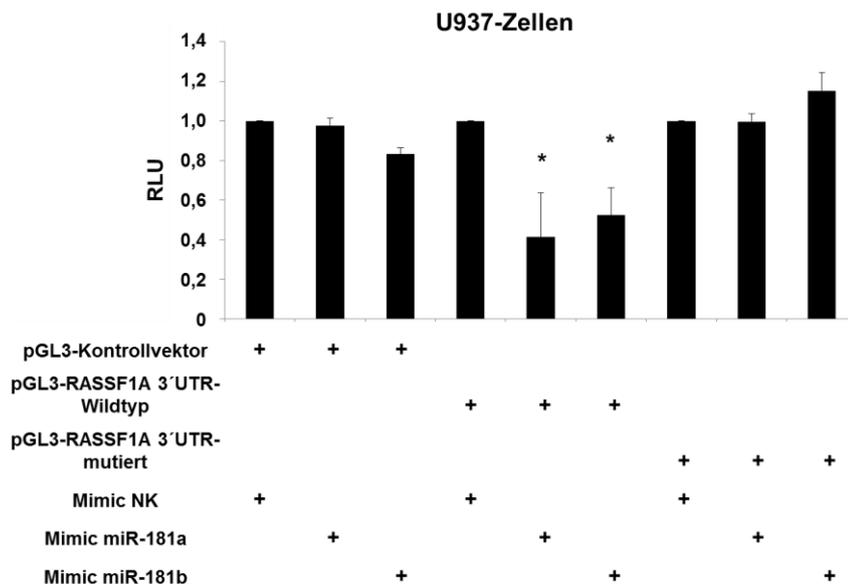


Abbildung 26 MiR-181a und miR-181b binden direkt an die RASSF1A 3'UTR.

Luziferase-Assay in U937-Zellen. Kotretransfektion der pGL3-Konstrukte (pGL3-Kontrollvektor bzw. pGL3-RASSF1A-WT oder pGL3-RASSF1A-mutiert) in Kombination mit den entsprechenden Mimic-Molekülen (Mimic miR-181a, miR-181b, NK) sowie des *Renilla*-Luziferase-Vektors. Zur Normalisierung wurde die gemessene Renilla-Luziferase-Aktivität genutzt. * $p \leq 0,05$.

3.5 Spezifische Suppression des RASSF1A-Proteins in der PML/RAR α -assoziierten APL

RASSF1A konnte bereits als ein wichtiger Regulator zellulärer Funktionen in zahlreichen Zelltypen beschrieben werden (245). Dabei moduliert es die zwei wichtigen im Krebs deregulierten Signalwege Apoptose und Zellzyklus (252), (239). Auch PML/RAR α induziert die onkogene Transformation durch die Deregulation von Zellzyklus und Apoptose (257). Aus diesem Grund wurde hypothetisiert, dass RASSF1A auch in der PML/RAR α -assoziierten APL als Tumorsuppressor fungieren könnte. Um dies zu belegen wurde initial eine Analyse der RASSF1A-Menge in

Knochenmarkszellproben von AML-Patienten sowie in gesunden Blutproben durchgeführt (Tabelle 4). Die Western Blot-Analyse zeigte eine signifikant reduzierte RASSF1A-Proteinmenge in APL-Patienten [t(15;17)] im Vergleich zu AML-Patienten mit normalem Karyotyp. Alle anderen untersuchten Subgruppen und die nicht-AML-Patienten wiesen dagegen keine signifikant veränderten RASSF1A-Proteinmengen auf (Abb. 27).

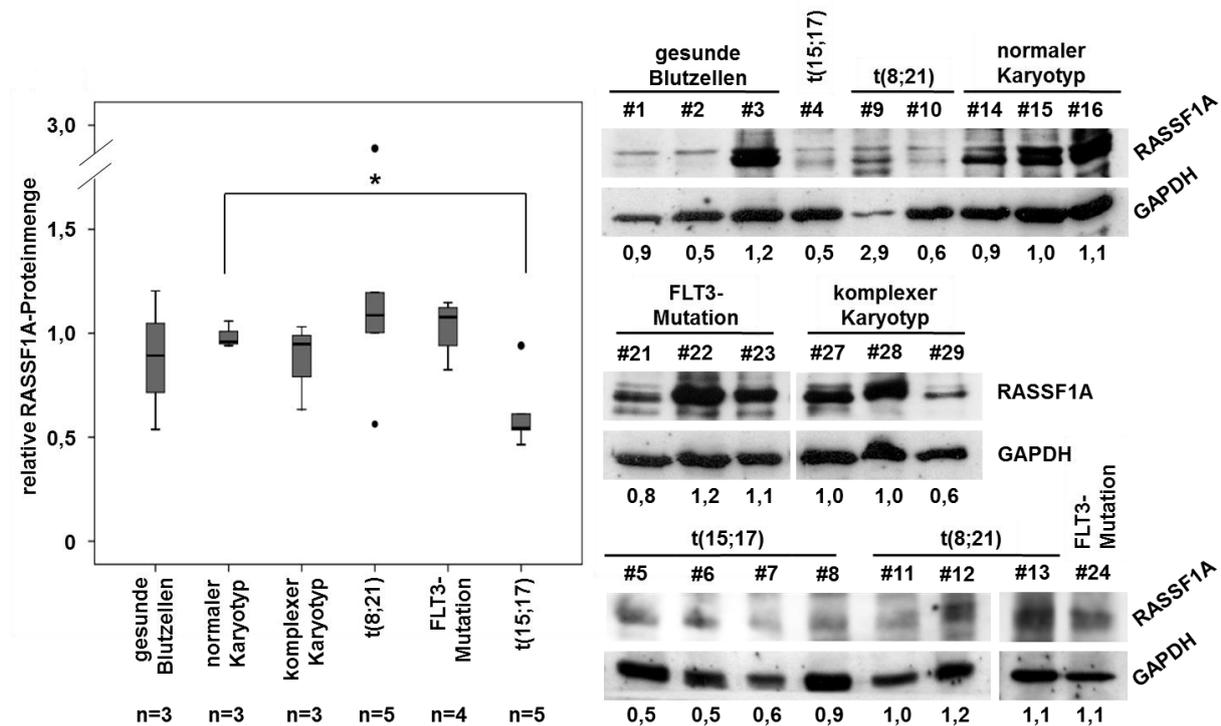


Abbildung 27 Verminderte RASSF1A-Proteinmenge in Knochenmarkszellen von APL-Patienten.

Analyse der RASSF1A-Proteinmenge in Knochenmarkszellproben von AML-Patienten und nicht-AML-Zellproben (gesunde Blutzellen) mittels Western Blot. Der Box-Whisker-Plot (links) zeigt die RASSF1A-Proteinmengen in den analysierten AML-Subgruppen und nicht-AML-Patienten. Rechts daneben befinden sich die dazugehörigen Western Blots. Die Zahlenwerte unter den Bildern korrespondieren zu den entsprechenden Ratios aus RASSF1A und GAPDH, welche zu Patient #15 normalisiert wurden. * $p \leq 0,05$.

Des Weiteren wurde in den untersuchten Patientenproben ein Nachweis der RASSF1A-mRNA-Menge mittels qPCR durchgeführt. Hier zeigte sich keine signifikant unterschiedliche RASSF1A-Expression in den einzelnen Subgruppen. Insbesondere in den Knochenmarksproben von Patienten mit t(15;17) konnte keine erniedrigte RASSF1A-mRNA-Menge nachgewiesen werden (Abb. 28).

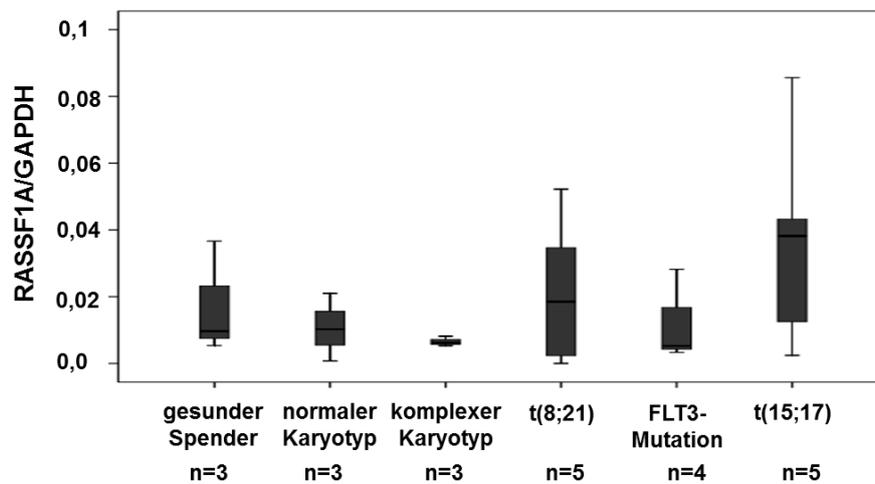


Abbildung 28 Die RASSF1A mRNA ist in der AML nicht reguliert.

Analyse der RASSF1A-mRNA-Menge mittels qPCR in verschiedenen AML-Subgruppen und nicht-AML Patienten. Die Normalisierung der RASSF1A-mRNA-Expressionswerte erfolgte anhand der Expression von GAPDH. Im Box-Whisker-Plot sind die ddCt-Werte dargestellt. Die Anzahl der untersuchten Patienten in jeder Gruppe (n) ist unter der entsprechenden Box dargestellt.

Außerdem wurde eine Analyse der RASSF1A-Proteinmenge in den bereits untersuchten PML/RAR α -*knock in*-Mäusen (C57Bl/6-mCG^{+PR}) durchgeführt. Im Knochenmark dieser Mäuse zeigte sich im Western Blot eine signifikante Reduktion der RASSF1A-Proteinmenge im Vergleich zu den Wildtypmäusen (C57Bl/6 -WT); (Abb. 29).

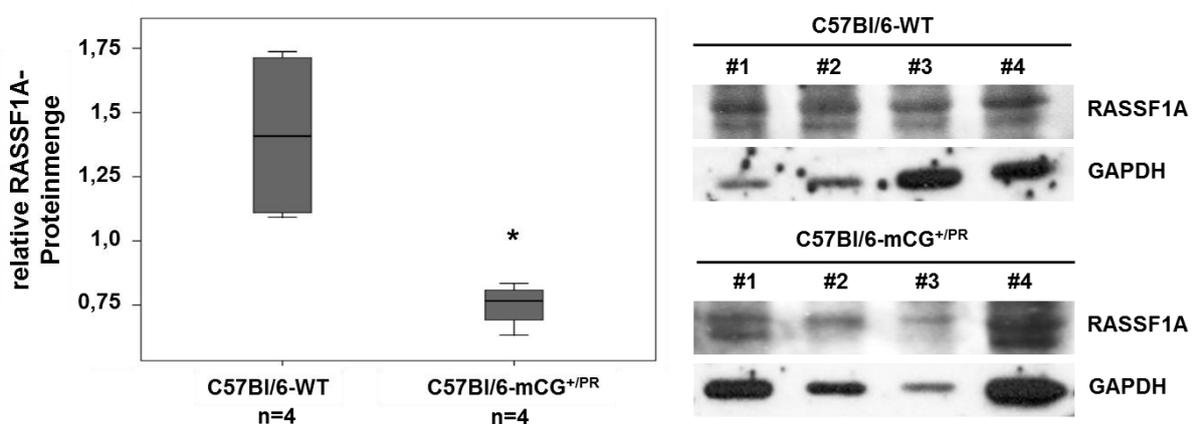


Abbildung 29 Erniedrigte RASSF1A-Proteinmengen im Knochenmark von PML/RAR α -*knock in*-Mäusen.

Analyse der RASSF1A-Proteinmenge in PML/RAR α -*knock in*- (C57Bl/6-mCG^{+PR}) und Wildtyp-Mäusen (C57Bl/6-WT). Rechts neben dem BOX-Whisker-Plot befinden sich die Original-Western Blots. Die Anzahl der untersuchten Mäuse in jeder Gruppe (n) ist unter der entsprechenden Box dargestellt. * $p \leq 0,05$.

3.6 RASSF1A induziert Apoptose in NB4-Zellen

Da bisher keine funktionelle Charakterisierung von RASSF1A in Leukämiezellen durchgeführt wurde, sollte in den folgenden Experimenten die biologische Relevanz von RASSF1A in der APL untersucht werden. Dafür wurde initial eine transiente Überexpression von RASSF1A in NB4-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden jeweils ein pcDNA3.1-RASSF1A-Konstrukt und der entsprechende pcDNA3.1-Leervektor als Kontrolle in NB4-Zellen mittels Elektroporation eingebracht. Anhand FACS-basierender Messung von Annexin V und 7-AAD wurde die Anzahl apoptotischer Zellen 24h nach der Transfektion bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass nach RASSF1A-Überexpression eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen, d.h. Verdopplung Annexin V+/ 7-AAD- -Zellen, im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten war (Abb. 30).

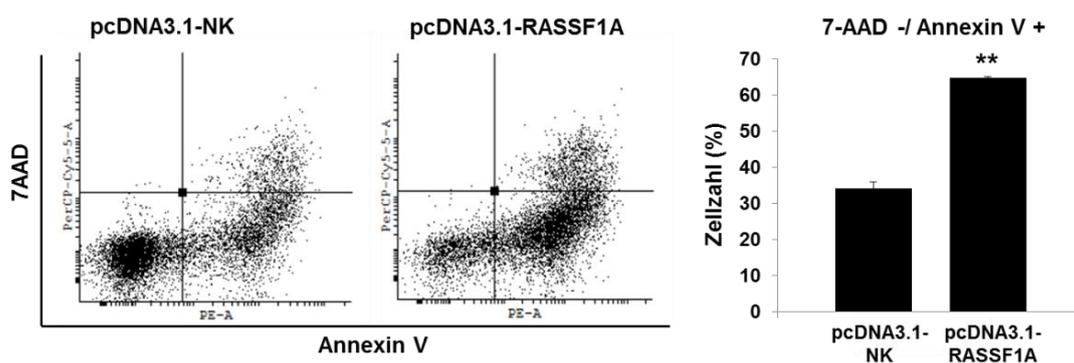


Abbildung 30 Transiente Expression von RASSF1A induziert Apoptose in NB4-Zellen.

Annexin V/7-AAD-Messung mittels FACS in NB4-Zellen nach transienter Expression von RASSF1A. Die Messung erfolgte 24h nach Transfektion. Das Diagramm (rechts) zeigt den Anteil 7-AAD-/ Annexin V+-Zellen nach Transfektion der pcDNA3.1-RASSF1A- bzw. pcDNA3.1-NK-Konstrukte. ** $p \leq 0,01$.

3.7 RASSF1A ist essentiell für die ATRA-abhängige Differenzierung von NB4-Zellen

In der weiteren funktionellen Charakterisierung von RASSF1A in der APL wurde eine Analyse des Proteins während der ATRA-induzierten Differenzierung durchgeführt. Hier wurden NB4-Zellen einmalig mit 1 μM ATRA und dem entsprechenden Volumen

DMSO behandelt. Die Messung des RASSF1A-Proteins mittels Western Blot zeigte eine deutliche Induktion der Proteinmenge auf das 1,4-Fache nach 48h und 2,9-Fache nach 72h in den ATRA-behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abb. 31 A). Des Weiteren wurde der Einfluss der Apoptose-induzierenden Agens Arsenitrioxid (As_2O_3) auf die RASSF1A-Proteinmenge untersucht. Hierfür wurden NB4-Zellen einmalig mit $1 \mu\text{M}$ As_2O_3 und dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels (1%-ige HCl-Lösung) behandelt. Im Western Blot konnte keine Zunahme des RASSF1A-Proteins nach As_2O_3 -Applikation im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Nach 48h zeigte sich sogar eine leichte Reduktion der RASSF1A-Proteinmenge um 20% im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 31 B).

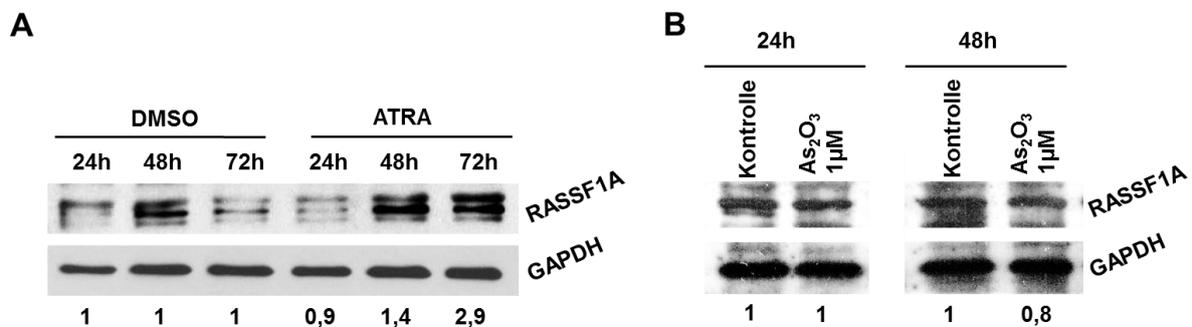


Abbildung 31 Analyse der RASSF1A-Proteinmenge in NB4-Zellen nach ATRA- und As_2O_3 -Behandlung.

A und **B** Analyse der RASSF1A-Proteinmenge mittels Western Blot in NB4-Zellen nach Applikation von ATRA und DMSO (**A**) sowie As_2O_3 und 1%-iger HCl-Lösung (**B**). Die Zahlenwerte unter den Western Blots korrespondieren zu den entsprechenden Ratios aus RASSF1A und GAPDH. Die Normalisierung erfolgte zu GAPDH.

Des Weiteren wurde die RASSF1A-Funktion mittels lentiviraler Transduktion RASSF1A-spezifischer shRNAs inhibiert. Hierfür wurde ein Set aus 4 verschiedenen shRNA-kodierenden lentiviralen Vektoren sowie der entsprechende Kontrollvektor in NB4-Zellen eingebracht (siehe 2.2.19, S. 44). Nach Antibiotika-basierender Selektion wurde die Effizienz des *knock downs* mittels qPCR-basierender Amplifikation der RASSF1A-mRNA untersucht. Die Resultate zeigten, dass nach Expression RASSF1A-spezifischer shRNA-Moleküle eine Verminderung der RASSF1A-mRNA-Menge um ca. 80% gegenüber der Kontrolle zu beobachten war (Abb. 32 A). Durch Applikation von $1 \mu\text{M}$ ATRA wurde in den shRNA-exprimierenden Zellen die granulozytäre Differenzierung induziert. Die Expression der Oberflächenmarker

CD11b und GCSF-R wurde anschließend mittels FACS gemessen. Die Menge an CD11b-Oberflächenmolekülen war 48h nach ATRA-Behandlung in den RASSF1A-shRNA-exprimierenden Zellen um ca. 80% gegenüber der Kontrolle reduziert. Eine nahezu komplette Repression des GCSF-R-Oberflächenmarkers konnte 72h nach ATRA-Gabe in den RASSF1A-shRNA-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Abb. 32 B).

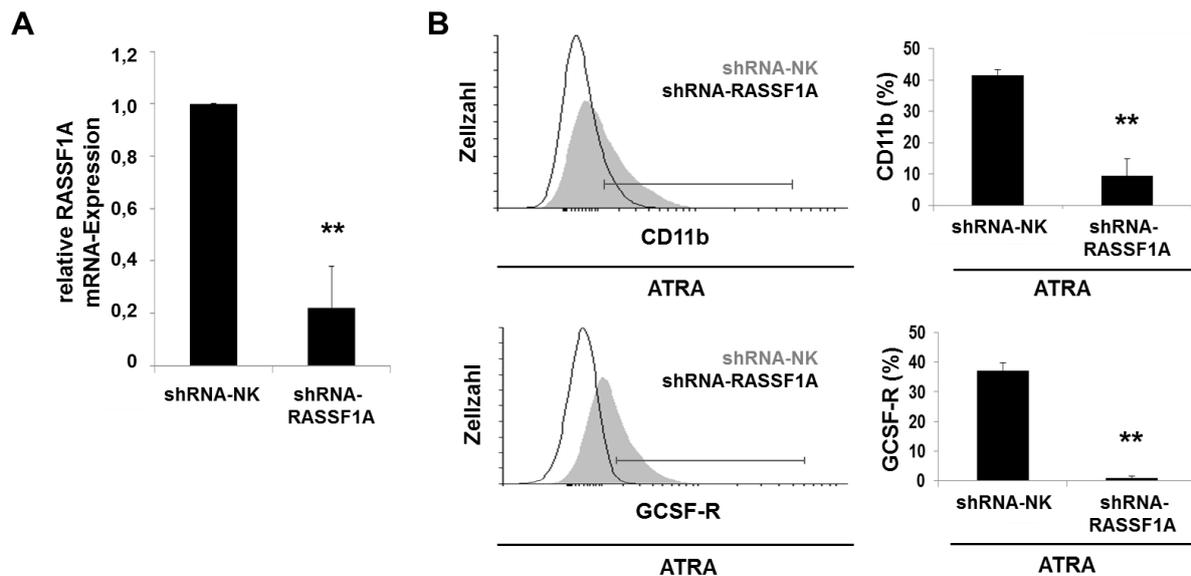


Abbildung 32 Verminderte ATRA-abhängige Differenzierung nach stabiler Inhibierung von RASSF1A in NB4-Zellen.

A Analyse der RASSF1A-mRNA-Menge nach lentiviraler Infektion von NB4-Zellen mit einem Mix aus 4 RASSF1A-shRNA-Konstrukten (shRNA-RASSF1A) sowie dem entsprechenden Kontrollkonstrukt (shRNA-NK). **B** Messung der CD11b- und GCSF-R-Expression mittels FACS. Das Histogramm (mitte oben) zeigt die CD11b-Expression 48h nach ATRA-Applikation. Das Histogramm (mitte unten) zeigt die GCSF-R-Expression 72h nach ATRA-Applikation. Die Balkendiagramme (rechts) repräsentieren den prozentualen Anteil CD11b- bzw. GCSF-R-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl im jeweiligen Transfektionsansatz. ** $p \leq 0,01$.

3.8 Das miR-181a/miR-181b-Cluster und RASSF1A modulieren den Zellzyklus durch die Regulation von Cyclin D1

Die bisherigen funktionellen Untersuchungen konnten dem miR-181a/miR-181b-Cluster eine Rolle in der PML/RAR α -assoziierten APL und den miR-181a/miR-181b-Ziel RASSF1A eine Rolle in der ATRA-induzierten Differenzierung der APL-Blasten zuweisen. Jedoch ist bisher der exakte Wirkmechanismus von RASSF1A in der APL

noch ungeklärt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass RASSF1A sowie ATRA zur Repression des Zellzyklusregulators Cyclin D1 führen (53); (252). Aufgrund dessen wurde Cyclin D1 als ein mögliches Ziel von RASSF1A in der APL untersucht werden.

3.8.1 RASSF1A ist ein negativer Regulator des Zellzyklusproteins Cyclin D1

Zunächst wurde die Cyclin D1-Proteinmenge in NB4-Zellen nach einmaliger Behandlung mit 1 μ M ATRA bzw. mit dem entsprechendem Volumen des Lösungsmittels DMSO bestimmt. Die Western Blot-Analyse zeigte eine Reduktion von Cyclin D1 auf 0,7 48h nach ATRA-Applikation im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abb. 33 A). Des Weiteren wurde das Cyclin D1-Protein 24h nach transienter Expression von RASSF1A in NB4-Zellen gemessen. Im Western Blot zeigte sich eine komplette Repression von Cyclin D1 infolge der artifiziellen RASSF1A-Expression im Vergleich zur Transfektion mit dem leeren Kontrollplasmid (Abb. 33 B).

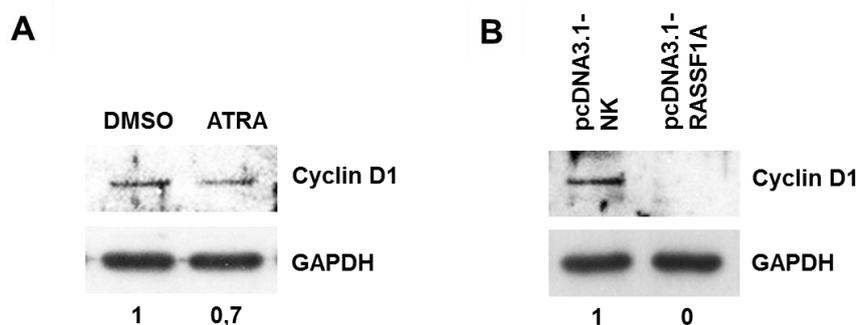


Abbildung 33 ATRA und RASSF1A reduzieren die Cyclin D1-Proteinmenge in NB4-Zellen.

A und **B** Analyse des Cyclin D1-Proteins in NB4-Zellen mittels Western Blot 48h nach ATRA- bzw. DMSO-Applikation (**A**) sowie 24h nach Transfektion des pcDNA3.1-RASSF1A-Vektors bzw. des Kontrollvektors (pcDNA3.1-NK), (**B**). Die Normalisierung erfolgte zu GAPDH. Die Zahlenwerte unter den Western Blots korrespondieren zu den entsprechenden Ratios aus Cyclin D1 und GAPDH.

Des Weiteren wurde der Einfluss des shRNA-vermittelten *knock downs* von RASSF1A auf den Zellzyklus untersucht. Hierfür wurden shRNA-exprimierende NB4-Zellen 24h nach Behandlung mit 1 μ M ATRA mit Propidiumjodid (PI) gefärbt und mittels FACS der DNA-Gehalt bestimmt. Die Analyse der einzelnen Zellzyklusphasen

zeigte eine Reduktion der Zellzahl in der G0/G1-Phase und eine Zunahme der Zellzahl in der S- und G2-Phase im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 34).

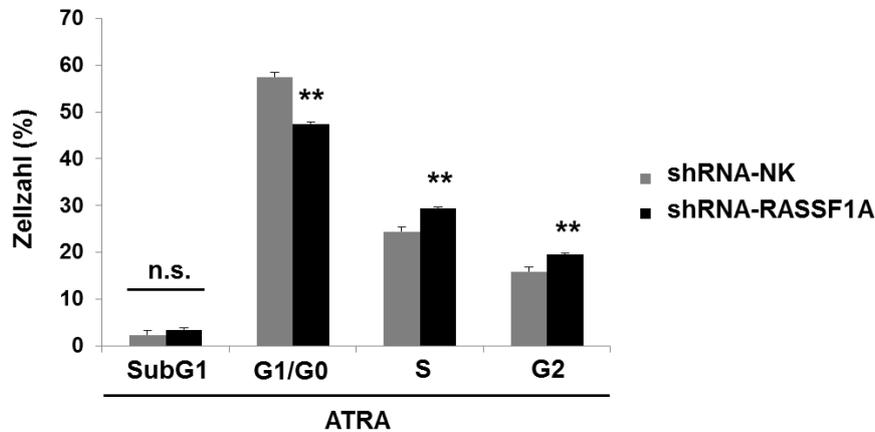


Abbildung 34 Sh-RNA-vermittelter *knock down* von RASSF1A inhibiert den ATRA-induzierten Zellzyklusarrest.

Zellzyklusanalyse von RASSF1A-shRNA- bzw. Kontroll-shRNA-exprimierenden NB4-Zellen 24h nach ATRA-Applikation (1 µM). n.s.= nicht signifikant. ** p ≤ 0,01.

3.8.2 Die miR-181a/miR-181b-vermittelte Induktion von Cyclin D1 ist RASSF1A abhängig

Neben dem Einfluss von RASSF1A auf Cyclin D1 wurden auch miR-181a- und miR-181b-vermittelte Effekte auf den Zellzyklus und die Cyclin D1-Proteinmenge untersucht. Die Zellzyklusanalyse von miR-ZIP-exprimierenden NB4-Zellen zeigte eine erhöhte Anzahl Zellen in der SubG1- und G1/G0-Phase sowie eine verringerte Zellzahl in der S- und G2-Phase nach stabiler Repression von miR-181a und miR-181b im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 35 A). Des Weiteren konnte 48h nach Transfektion von miR-181a- sowie miR-181b-Mimic-Molekülen eine verstärkte Cyclin D1-Proteinmenge in NB4-Zellen im Vergleich zur Kontrolle mittels Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 35 B). Zum Nachweis der RASSF1A-Abhängigkeit der miR-181a- und miR-181b-vermittelten Induktion von Cyclin D1, wurde eine Kotransfektion von miR-181a- bzw. miR-181b-Mimic-Molekülen und pcDNA3.1-RASSF1A bzw. pcDNA3.1-NK (Kontrollvektor) in NB4-Zellen durchgeführt. Dabei wird RASSF1A als cDNA ohne natürliche 3'UTR exprimiert, was die so generierte

RASSF1A-mRNA als Ziel des miR-181a/miR-181b-Clusters ausschließt. Die Analyse der Cyclin D1-Proteinmenge 48h nach Transfektion zeigte, dass die Expression von RASSF1A ohne funktionelle 3'UTR die miR-181a- und miR-181b-vermittelte Induktion von Cyclin D1 verhindert (Abb. 35 C).

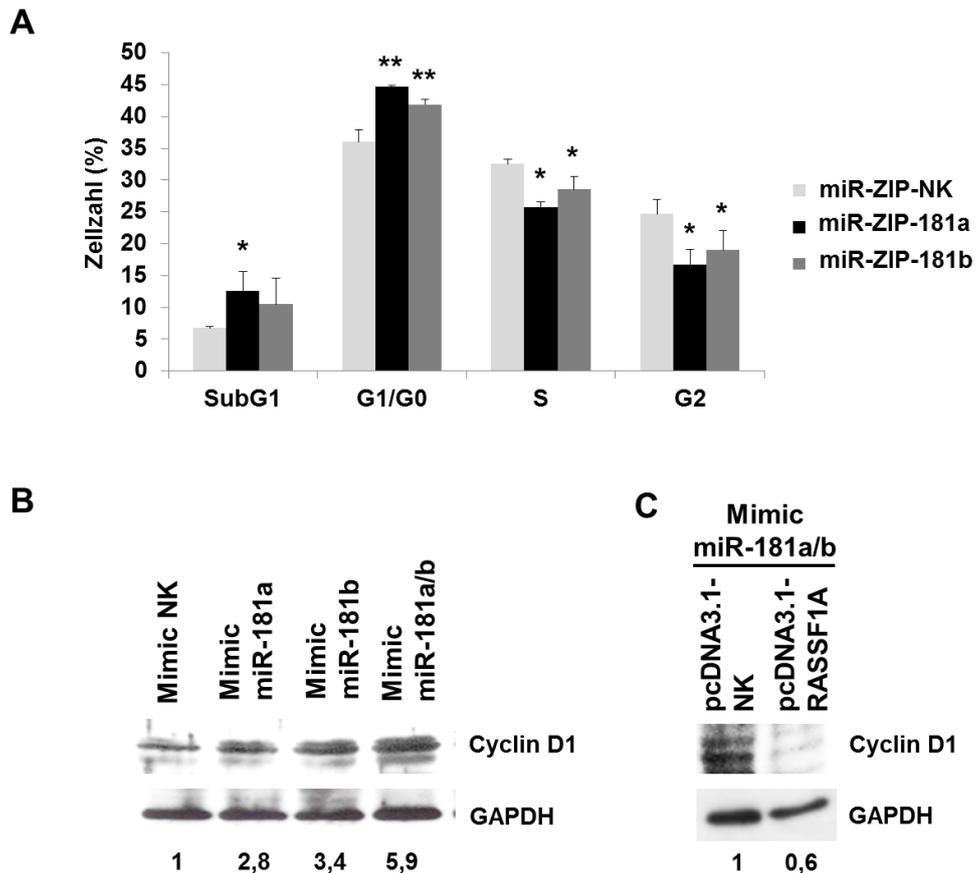


Abbildung 35 MiR-181a- und miR-181b-vermittelte Induktion von Cyclin D1 in NB4-Zellen ist RASSF1A-abhängig.

A Zellzyklusanalyse miR-ZIP-exprimierender Zellen (miR-ZIP-181a,-181b und -NK). Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil der Zellen in der entsprechenden Phase des Zellzykluses. **B** und **C** Western Blot für Cyclin D1 48h nach Transfektion von miR-181a-, miR-181b-, NK-Mimic-Molekülen (**B**) und 48h nach Kotretransfektion von microRNA-Mimics und pcDNA3.1-RASSF1A bzw. pcDNA3.1-NK (**C**). Die Normalisierung erfolgte zu GAPDH. Die Zahlenwerte unter den Western Blots korrespondieren zu den entsprechenden Ratios aus Cyclin D1 und GAPDH. * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$.

4 Diskussion

MicroRNAs nehmen als Feinregulatoren der Genexpression eine zentrale Rolle in der Steuerung zellulärer Prozesse ein. Bei der malignen Transformation einer Zelle werden diese basalen Prozesse gestört und führen zur Entstehung von Krebs. In diesem Zusammenhang konnte eine immer größer werdende Zahl von Publikationen die Bedeutung der microRNAs in der Entstehung und Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps zeigen und hervorheben. So konnte für das in der Hämatopoese wichtige miR-181a/miR-181b-Clusters (115) die Expression sowie verschiedene Funktionsweisen in der Leukämie und im speziellen in der AML beschrieben werden (214), (170). Dies deutet auf eine spezifische Rolle des microRNA-Clusters in der malignen Hämatopoese hin. So beschrieben Careccia et al. eine signifikant erhöhte Expression des miR-181a/miR-181b-Clusters in Blasten von Patienten mit akuter Promyelozytenleukämie (APL) im Vergleich zu gesunden Promyelozyten (212). Über die biologische Relevanz von miR-181a und miR-181b in der APL ist bisher nur unzureichend geklärt. Lediglich in einer Arbeit von Zhuang et al. wurde der inhibitorische Effekt von miR-181a auf die ATRA-induzierte Differenzierung von APL-Zellen durch die Repression der Adenylatcyclase AC9 beschrieben (267). Im Vordergrund der vorliegenden Arbeit stand somit die detaillierte funktionelle Analyse des miR-181a/miR-181b-Clusters sowie die Identifikation neuer Ziele, welche in die Genese bzw. Aufrechterhaltung der APL involviert sind.

4.1 APL-spezifische Expression und Funktion des miR-181a/miR-181b-Clusters

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die klinisch zur Behandlung der APL angewandte Agens all-trans Retinsäure (ATRA) die Expression der gesamten miR-181-Familie in der APL-Zelllinie NB4 reprimiert (Abb. 7 B). Die in einem genomischen Cluster organisierten miR-181a und miR-181b liegen dabei in einem ähnlich hohem Expressionsniveau vor, was darauf deutet, dass beide microRNAs unter der Kontrolle eines gemeinsamen Promoters stehen. Daneben

werden die ebenfalls in einem genomischen Cluster organisierten miR-181c und miR-181d nach ATRA-Applikation im NB4-Zellsystem ebenfalls reprimiert, weisen jedoch deutlich unterschiedliche Expressionsniveaus auf. Diese Beobachtung könnte darauf deuten, dass neben der transkriptionellen Regulation der nur 17 Basenpaar entfernt liegenden miR-181c und miR-181d posttranskriptionell wirkende Faktoren ursächlich sind. Des Weiteren handelt es sich bei der Repression des hämatopoetisch-relevanten miR-181a/miR-181b-Clusters um einen über den Differenzierungszeitraum hinweg stabilen Effekt. Dieser scheint somit im direkten Zusammenhang mit der ATRA-abhängigen Differenzierung zu stehen (Abb. 8 D). Auch *in vivo* konnten diese Beobachtungen durch die Analyse von APL-Patientenproben vor und während der ATRA-Therapie verifiziert werden (Abb.9). Bestätigt werden diese Daten durch diverse Publikationen anderer Arbeitsgruppen, welche ebenfalls die ATRA-abhängige Repression einer oder beider microRNAs des miR-181a/miR-181b-Clusters beschreiben (125), (43), (142).

In der klinischen Behandlung der APL werden im Rahmen der Chemotherapie zytostatische Agenzien sowie Arsentrioxid eingesetzt (29), (268). Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass diese Stoffe keinen reprimierenden Einfluss auf die miR-181a/miR-181b-Expression in APL-Zellen haben (Abb. 10). Ursächlich hierfür könnte die Tatsache sein, dass diese Agenzien vorwiegend apoptotische Effekte und nur in einem sehr geringem Maße Differenzierung in AML-Zellen hervorrufen (Abb. 11), (62), (64), (269), (270), (271). Im Gegensatz dazu induziert die Gabe von ATRA die Differenzierung von APL-Zellen zu reifen Granulozyten ohne die Induktion von Apoptose (Abb. 6, Abb. 11), (62), (54). Diese Beobachtungen untermauern die Annahme, dass es sich bei der ATRA-basierenden Repression von miR-181a und miR-181b um einen vorrangig differenzierungsassoziierten Effekt handelt. Zudem deuten diese Ergebnisse auf eine Relevanz des microRNA-Clusters in der APL-Pathogenese.

ATRA führt zum Abbau von PML/RAR α und verändert dadurch die Genexpression gravierend (43), (42). Dies lässt vermuten, dass auch die Expression von miR-181a und miR-181b in Abhängigkeit vom onkogenen Fusionsprotein PML/RAR α reguliert wird. Durch die Analyse der miR-181a/miR-181b-Expression in den ATRA-responsiblen nicht-PML/RAR α -tragenden Zelllinien U937 und HL60 konnte diese Vermutung untermauert werden. Beide Zelllinien differenzieren nach Behandlung mit

pharmakologischen Dosen ATRA zu Granulozyten mit der charakteristischen Expression des Oberflächenmarkers CD11b (Abb. 8 B, C), zeigen jedoch keine Repression der miR-181a- und miR-181b-Expression (Abb. 8 E, F). Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese einer PML/RAR α -abhängigen Regulation des miR-181a/miR-181b-Clusters. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass Su et al. die ATRA-abhängige Suppression der miR-181-Familie in HL60-Zellen beobachten konnten (170). Im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit verwendeten und im Allgemeinen als pharmakologische Dosis genutzten ATRA-Konzentration von 1 μ M, haben Su et al. in ihrer Arbeit eine Konzentration von 2 μ M eingesetzt. Diese höhere ATRA-Konzentration könnte mögliche toxische Effekte zur Folge haben, was die abweichenden Resultate erklären könnte.

Neben der transkriptionellen Repression von Zielgenen (42), kann das onkogene Fusionsprotein PML/RAR α auch die Expression spezifischer Gene induzieren (272), (43). Nach Literaturangaben könnte dieser Effekt indirekt durch die Rekrutierung von Korepressoren (273), (274) bzw. Aktivierung von Kofaktoren (275), (276), (277) erzeugt zu werden. In der vorliegenden Arbeit konnte die PML/RAR α -abhängige Induktion der miR-181a- und miR-181b-Expression *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden. So wurde eine erhöhte miR-181a- und miR-181b-Expression in der PML/RAR α -exprimierenden Zelllinie NB4, in Knochenmarkszellen von PML/RAR α -knock in-Mäusen und in Knochenmarksproben von APL-Patienten nachgewiesen (Abb.13, 15). Ähnliche Resultate konnten bereits in Publikationen von Li et al. (132), Jongen-Lavrencic et al. (131) und Su et al. (170) mittels Analyse primärer AML-Patientenproben präsentiert werden. Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das miR-181a/miR-181b-Cluster unmittelbar nach Induktion von PML/RAR α in PR9-Zellen verstärkt exprimiert wird (Abb. 14). Dies weist auf einen direkten Einfluss von PML/RAR α auf die Transkription der beiden microRNAs hin. Dabei ist anzumerken, dass bisher keine PML/RAR α -Bindestellen im Promotorbereich der *MIR181A1/MIR181B1*- und *MIR181A2/MIR181B2*-Gene nachgewiesen wurden (43). Auch in eigenen Promotoranalysen in einem 2 kb großen Bereich vor dem Transkriptionsstart der microRNA-Gene konnten keine RAR α -Bindestellen identifiziert werden. Die im Rahmen der Dissertation gewonnenen Ergebnisse zur Regulation des miR-181a/miR-181b-Clusters stehen somit im Einklang mit bisherigen Veröffentlichungen und geben erste Hinweise auf

eine PML/RAR α -abhängige Induktion des microRNA-Clusters. Sie lassen jedoch die Frage nach dem exakten Mechanismus noch offen.

Interessanterweise konnte auch im AML-Subtyp t(8;21), welcher durch die Expression des onkogenen Fusionsproteins AML1-ETO charakterisiert ist, eine erhöhte, jedoch nicht signifikante, miR-181a- und miR-181b-Expression gemessen werden (Abb.15 B). Sowohl bei PML/RAR α als auch AML1/ETO handelt es sich um chromosomale Translokationen, welche ähnliche Veränderungen hinsichtlich der Expression bestimmter Gene hervorrufen können. So werden z. B. die differenzierungsrelevanten Mitglieder der C/EBP-Familie in t(15;17) als auch in t(8;21) reprimiert (278), (274). In der AML resultiert die Wiederherstellung der C/EBP α -Expression und -Funktion zur granulozytären Differenzierung und Reifung (278). In der APL ist C/EBP β ein direktes Ziel des Retinsäurerezeptors und wird durch die Behandlung mit ATRA induziert (Abb. 6), (56). In diesem Zusammenhang konnte auch die inverse Korrelation der miR-181a- und miR-181b-Expression mit der C/EBP β -mRNA-Expression während der ATRA-basierenden Differenzierung beobachtet werden (Abb. 6 und Abb. 8 D). Neben der weitläufig beschriebenen Rolle der C/EBPs als transkriptionelle Aktivatoren (56), (279) konnten ihnen auch repressorische Eigenschaften zugewiesen werden (280). So könnten C/EBP-Proteine, welche in der APL durch PML/RAR α reprimiert werden, als transkriptionelle Repressoren des miR-181a/miR-181b-Clusters in der gesunden Hämatopoese wirken. Unterstützt wird diese Hypothese durch signifikant erhöhte miR-181a-Expressionswerte in AML-Patienten, welche durch *CEBPA*-Genmutationen einen Funktionalitätsverlust des C/EBP α -Proteins aufweisen (205). Des Weiteren konnten zahlreiche Publikationen einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten miR-181a- und miR-181b-Expression und einer guten Verlaufsprognose für Patienten mit einer CN- bzw. CA-AML aufzeigen (209), (205), (206), (208). Auch in der APL werden durch die Kombinationstherapie von Chemostatika, ATRA und Arsentrioxid Komplett-Remissionsraten von bis zu 80% erreicht (29), (30), (31), (32). Somit könnte eine erhöhte miR-181a/miR-181b-Expression im direkten Zusammenhang mit einem guten Ansprechen der AML-Patienten auf die Therapie stehen. Die in dieser Arbeit gezeigte APL-spezifische Expression des miR-181a/miR-181b-Clusters und die signifikante Reduktion infolge der ATRA-Behandlung *in vitro* und *in vivo* deuten auf

das microRNA-Clusters als ein möglicher prognostischen Marker in der APL und unterstützen somit bisherige Erkenntnisse auf diesem Gebiet (214).

Der miR-181-Familie konnte bereits eine Rolle bei der Entstehung von Krebs zugewiesen werden (178), (191), (206), (209). Dabei können die einzelnen miR-181-Mitglieder in Abhängigkeit vom untersuchten Gewebe sowohl als Tumorsuppressoren als auch als Onkogene fungieren. Die Tatsache, dass die miR-181a- und miR-181b-Expression in der APL signifikant erhöht ist (Abb. 15), (212), legt die Vermutung nahe, dass beide microRNAs in die Ausbildung des onkogenen Phänotyps der PML/RAR α -abhängigen APL involviert sind. Die im Rahmen der Dissertation durchgeführten funktionellen Untersuchungen zeigten, dass der stabile miR-ZIP-vermittelte *knock down* von miR-181a- bzw. miR-181b die Proliferation und Koloniebildungskapazität hemmt sowie Apoptose in APL-Zellen induziert (Abb. 17 – 20). Interessanterweise, konnten hier unterschiedlich starke miR-ZIP-vermittelte *knock down-Effekte* beobachtet werden. So führt die Reduktion der miR-181a-Menge zu einer Verdopplung der Menge an p53, einem zentralen Regulator von Apoptose und Zellzyklus (281), wohingegen die p53-Menge in den miR-ZIP-181b-exprimierenden Zellen nur unwesentlich im Vergleich zur Kontrolle erhöht ist (Abb. 17 A). Dem entsprechend ist auch die Apoptoserate in den miR-ZIP-181a-exprimierenden Zellen im Vergleich zu der in den miR-ZIP-181b-exprimierenden Zellen um ca. 30% erhöht (Abb. 17 B). Auch im *replating assay* führt der *knock down* von miR-181a zu einer starken initialen Reduktion der Koloniezahl, welche in den folgenden Aussaaten wieder zunimmt (Abb. 18). Dies korreliert mit den Apoptosedaten und zeigt einen starken miR-181a-vermittelten Einfluss auf zelluläre Prozesse, welche das Überleben der Zellen beeinflussen. Dagegen wird durch den *knock down* von miR-181b primär ein weniger starker Effekt auf Apoptose und Koloniezahl in der ersten Aussaat des *replating assays* ausgeübt. Jedoch nimmt im Laufe des Assays die Koloniezahl der miR-ZIP-181b-exprimierenden Zellen stetig ab. Dies wiederum deutet auf einen möglichen Einfluss von miR-181b auf die *self-renewal*-Kapazität der APL-Zellen. Möglicherweise ist dieser Effekt für den *knock down* von miR-181a nicht nachweisbar, da hier die primär stärker wirkende miR-ZIP-181a-vermittelte Apoptose im Vordergrund steht. Diese abweichenden Beobachtungen in Bezug auf die biologische Funktion der beiden microRNAs könnten durch unterschiedliche Sequenzhomologien zwischen microRNA und Ziel-

mRNA sowie durch die mögliche Repression mehrerer Ziel-mRNAs verursacht werden.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die ektopische Expression von miR-181a und miR-181b die ATRA-induzierte Differenzierung von APL-Zellen hemmt (Abb. 21). Dabei zeigte sich, dass die gleichzeitige Transfektion von miR-181a- und miR-181b-Mimic-Molekülen lediglich einen schwachen synergistischen Effekt auf die ATRA-vermittelte Differenzierung der APL-Zellen hat. Ursache hierfür könnte die unnatürlich starke Anreicherung von microRNA-Mimic-Molekülen in den Zellen nach der Transfektion und der daraus resultierenden Sättigung der microRNA-Bindestellen in den 3'UTRs der Ziel-mRNAs sein, welche durch die simultane Transfektion von miR-181a- und miR-181b-Mimic-Molekülen nicht verstärkt werden kann. Nach miR-ZIP-vermitteltem *knock down* der beiden microRNAs konnte keine Analyse eines möglichen synergistischen Effekts durchgeführt werden, da die simultane Expression der beiden antisense-Moleküle unter der transkriptionellen Kontrolle eines Promoters keine zusätzliche Repression des miR-181a/miR-181b-Clusters im Vergleich zu den Einzeldisexpressionen erzeugen konnte (Abb. 16). Zusammenfassend, konnte einerseits die miR-181a/miR-181b-abhängige Proliferation der APL-Zellen sowie ein miR-181a/miR-181b-vermittelter Block der Differenzierung gezeigt werden. Somit konnte anhand der durchgeführten Experimente eine funktionelle Relevanz des miR-181a/miR-181b-Clusters für die Ausbildung des PML/RAR α -abhängigen onkogenen Phänotyps nachgewiesen werden. Kürzlich publizierte Daten von Su et al. (170) bekräftigen die hier gemachten Beobachtungen. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass miR-181a die myeloide Differenzierung in HL60-Zellen und CD34 $^{+}$ -Progenitorzellen blockiert und als onkogene microRNA fungieren kann. Dem gegenüber stehen Daten von Hickey et al. (206) und Li et al. (209), welche miR-181a und miR-181b als antileukämische Faktoren in der AML beschreiben. Einerseits unterstützen die in diesen Publikationen gemachten Beobachtungen die Rolle von miR-181a und miR-181b als gute prognostische Faktoren in der AML. Andererseits stehen die dort gemachten Beobachtungen hinsichtlich der miR-181-Funktionalität im Gegensatz zu den Daten von Su et al. (170) und denen, die im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurden und miR-181a und miR-181b einen onkogenen Charakter zuschreiben. Eine mögliche Erklärung für diese divergenten Beobachtungen könnte die Tatsache sein, dass in

den Arbeiten von Hickey et al. und Li et al. alle funktionellen Studien in AML-Zelllinien mit einer Translokation *des mixed lineage leukemia (MLL)-Gens* [t(4;11) und t(9;11)] durchgeführt wurden. Im Gegensatz zur APL ist ein *MLL-rearrangement* nicht auf einen speziellen AML-Subtyp beschränkt (28). Ebenso haben Patienten mit einem *MLL-rearrangement* im Gegensatz zu APL-Patienten eine schlechte Prognose (282). Daher könnte man annehmen, dass durch die beiden Translokationstypen unterschiedliche miR-181-Expressionen verursacht werden. Zudem könnten durch das Vorhandensein unterschiedlicher mRNA-Ziele bzw. spezifischer Selektionsmechanismen verschiedene Funktionsweisen des microRNA-Clusters hervorgerufen werden. Dabei bleibt die Frage offen, ob ein onkogener oder ein tumorsuppressiver Charakter des miR-181a/miR-181b-Clusters in der AML im Vordergrund steht oder ob er sich spezifisch nach den zugrundeliegenden, die AML auslösenden, Faktoren richtet.

Die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen zur Expression und Funktion des miR-181a/miR-181b-Clusters unterstreichen die hochspezifische Funktionsweise von microRNAs, welche maßgeblich von der Expression der microRNAs und dem Vorhandensein putativer Ziele bestimmt wird und durch eine Vielzahl verschiedener Faktoren reguliert werden kann.

4.2 RASSF1A als neuer differenzierungsassoziierter Faktor in der APL

Im Krebs vermitteln onkogene microRNAs ihre Funktion durch die Inhibierung von Tumorsuppressoren (283), (195), (180), (284). So konnte z. B. in der APL miR-146a ein onkogener Charakter durch Repression von Smad4 zugewiesen werden (145), (285). In der vorliegenden Arbeit wurde der bereits gut beschriebene Tumorsuppressor RASSF1A (*Ras association domain family member 1 isoform A*) als ein direktes Ziel von miR-181a und miR-181b in der APL beschrieben (Abb. 26). Die Mitglieder der miR-181-Familie sind die einzigen microRNAs, welche 3 konservierte Bindestellen in der 3'UTR von RASSF1A besitzen (Abb. 22).

Bereits Meng et al. konnten RASSF1A als direktes Ziel von miR-181a in Leberkrebszellen identifizieren (230). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die

direkte Interaktion von miR181a und miR-181b mit der 3'UTR von RASSF1A in AML-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 26). Verifiziert werden konnte dies durch die Transfektion von miR-181a- und miR-181b-Mimic-Molekülen bzw. durch einen stabilen *knock down* von miR-181a und miR-181b und der daraus resultierenden Veränderung der RASSF1A-Proteinmenge in AML- und APL-Zellen (Abb. 24). Zudem konnte eine inverse Korrelation zwischen der RASSF1A-Proteinmenge und der miR-181a-/miR-181b-Menge in NB4- und U937-Zellen, in PML/RAR α -*knock in*-Mäusen sowie nach ATRA-induzierter Differenzierung von APL-Zellen beobachtet werden (Abb. 8 D; 13; 15 A; 23; 31 A). Diese Daten bekräftigen die miR-181a- und miR-181b-vermittelte Repression des Tumorsuppressors RASSF1A in der APL.

RASSF1A wird in einer Vielzahl von Krebserkrankungen durch Promotorhypermethylierung inaktiviert. In der AML konnten bisher keine Promotorhypermethylierungen am RASSF1A-Genlokus nachgewiesen werden (231), (232), (233). Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Nachweis des RASSF1A-Proteins in AML-Zelllinien und in primären AML-Patientenproben konnte die bisher publizierten Daten bestätigen. Dabei zeigt sich, dass in der APL, d.h. in NB4-Zellen, Patientenproben mit t(15;17) sowie PML/RAR α -*knock in*-Mäusen, deutlich geringere RASSF1A-Proteinmengen als in den Kontrollen nachweisbar waren (Abb. 23, 27, 29). In Verbindung mit den erhöhten miR-181a/miR-181b-Expressionswerten in der APL (Abb. 15) und der zunehmenden RASSF1A-Proteinmenge bei gleichzeitiger Repression des miR-181a/miR-181b-Clusters während der ATRA-abhängigen Differenzierung (Abb. 8 D; 31 A), zeigen diese Daten eine APL-spezifische inverse Korrelation des RASSF1A-Proteins und der miR-181a/miR-181b-Expression, und deutet somit auf einen APL-spezifischen Mechanismus.

Interessanterweise zeigte die Messung der RASSF1A-mRNA mittels qPCR in primären AML-Patientenproben keine APL-spezifische Suppression (Abb. 28). Unterstützt wird diese Beobachtung durch bereits publizierte RASSF1A-mRNA-Expressionsdaten in AML-Patienten (234). Hier konnte ebenfalls keine veränderte RASSF1A-mRNA-Menge im Zusammenhang mit einem bestimmten Subtyp gezeigt werden. Diese Daten deuten auf mögliche posttranskriptionelle Regulationsmechanismen in der AML, welche neben der APL-spezifischen miR-181a/miR-181b-vermittelten Repression von RASSF1A die Funktionalität des Tumorsuppressors inhibieren könnten. In diesem Zusammenhang ist anzumerken,

dass in der AML-Zelllinie HL60 ebenfalls eine sehr geringe RASSF1A-Proteinmenge detektiert werden konnte (Abb. 23). Somit könnte auch hier eine microRNA-vermittelte posttranskriptionelle Regulation von RASSF1A vorliegen. Weitere Studien müssten in diesem Zusammenhang klären, ob auch hier ein miR-181a/miR-181b-abhängiger Mechanismus zugrunde liegt. Des Weiteren ergab die Analyse der RASSF1A-Proteinmenge in gesunden Zellen (gesunde Blutzellen und CD34+-Zellen) keinen signifikanten Unterschied zur RASSF1A-Proteinmenge in den untersuchten malignen AML-Zellen, mit Ausnahme der PML/RAR α -assoziierten APL. Somit könnten in den anderen AML-Subtypen Faktoren wirken, welche ausschließlich die Funktionalität des Tumorsuppressors und nicht die Proteinmenge beeinflussen. Weiteren Untersuchungen sind hier notwendig, um diese Faktoren näher zu charakterisieren.

Interessanterweise, konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression des *RASSF1*-Gens in den verschiedenen Funktionszellen des hämatopoetischen Systems besonders hoch ist (Anhang A 1); (286). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Mitglieder dieser Genfamilie in die Funktionalität hämatopoetischer Zellen involviert sind und dass deren Deregulation in die AML-Pathogenese involviert sein könnte. Bisher konnte jedoch noch keine funktionelle Relevanz des RASSF1A-Proteins in der hämatopoetischen Differenzierung bzw. Leukämie beschrieben werden. RASSF1A ist ein Tumorsuppressor, dessen Reexpression in RASSF1A-defizienten Zellen zur Minderung der Tumorigenität führt (245), (231). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte ektopische Expression von RASSF1A in NB4-Zellen resultierte in einer signifikant erhöhten Apoptoserate (Abb. 30), wodurch RASSF1A eine tumorsuppressive Funktion in der APL zugewiesen werden konnte. Dem gegenüber steht die Beobachtung, dass während der mittels Arsentrioxid induzierten Apoptose keine Induktion von RASSF1A in NB4-Zellen zu detektieren war (Abb. 31 B). Hier könnten infolge der As₂O₃-Behandlung apoptoseassoziierte Signalwege induziert werden, welche die Induktion von RASSF1A nicht einschließen. Zudem konnte auch keine Reduktion der miR-181a- und miR-181b-Expression infolge der Behandlung mit As₂O₃ in NB4-Zellen beobachtet werden (Abb. 10). Diese Beobachtungen unterstützen den hypothetisierten APL-spezifischen und differenzierungsassoziierten Zusammenhang zwischen der Expression des miR-181a/miR-181b-Clusters und RASSF1A. Auch der Nachweis der funktionellen

Relevanz von RASSF1A während der ATRA-induzierten Differenzierung durch die Inhibierung der ATRA-abhängigen Granulopoese infolge des shRNA-vermitteltem *knock downs* von RASSF1A bekräftigt diese Aussage (Abb. 32). Somit scheint auch in der APL, wie bereits von Donninger et al. postuliert, die RASSF1A-vermittelte Funktion weniger apoptoseassoziiert, sondern vielmehr differenzierungsassoziiert, d.h. zellzyklusregulierend, zu sein (287).

4.3 Funktionelle Relevanz der miR-181a/miR-181b-RASSF1A-Interaktion bei der Deregulation des Zellzykluses in der APL

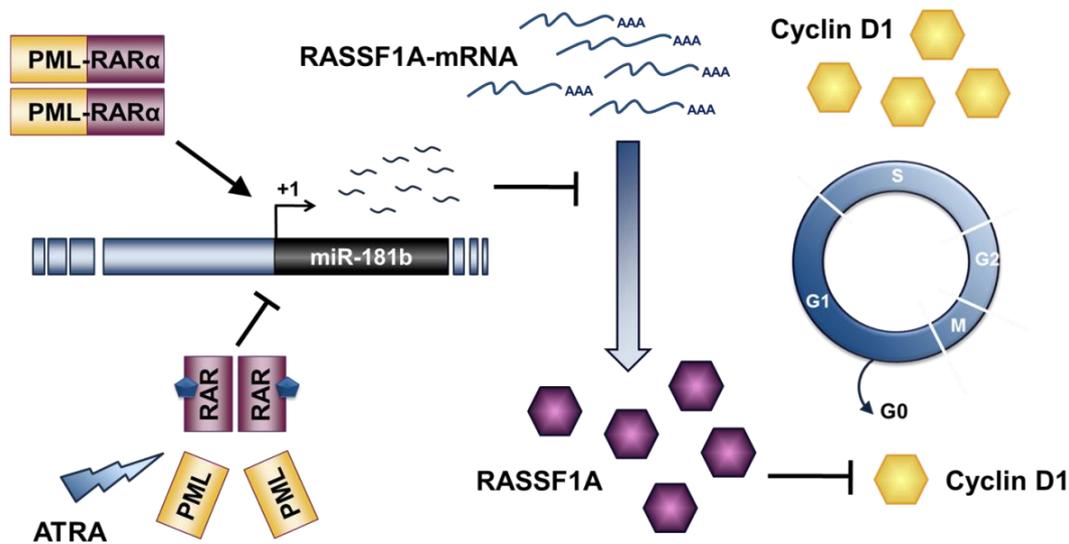
Der Prozess der Differenzierung von unreifen Zellen zu reifen spezialisierten Funktionszellen ist mit dem Austritt der Zelle aus dem Zellzyklus verbunden. Dieser komplexe Prozess wird durch die Modifikation diverser zellzyklusregulierender Proteine gesteuert (288). Shivakumar et al. konnten zeigen, dass RASSF1A den Übergang von der G1-Phase zur Synthese-Phase des Zellzyklus effektiv durch den Block der Cyclin D1-Akkumulation inhibiert (252). In der APL wiederum schließt die Induktion der Differenzierung nach ATRA-Behandlung die Modulation spezifischer Zellzyklus-regulierender Proteine wie Cyclin D1 ein (289). In der vorliegenden Arbeit konnte die ATRA-induzierte Repression von Cyclin D1 bestätigt werden (Abb. 33 A). Ebenso konnte der supprimierende Effekt von RASSF1A auf die Cyclin D1-Proteinmenge durch transiente Überexpression des Tumorsuppressors in NB4-Zellen veranschaulicht werden (Abb. 33 B). Zudem zeigt die Zellzyklusanalyse ATRA-induzierter APL-Zellen, in welchen die RASSF1A-Proteinmenge mittels shRNA reprimiert wurde, eine deutliche Reduktion in der G1-Phase und einen Anstieg in der S- und G2-Phase (Abb. 34). Diese Ergebnisse deuten auf eine Notwendigkeit von RASSF1A für die Induktion des Zellzyklusarrests während der ATRA-abhängigen Granulopoese der APL-Zellen. Des Weiteren zeigte die Zellzyklusanalyse miR-ZIP-exprimierender Zellen eine Reduktion in der S- und G2-Phase mit entsprechender Zunahme der G1/G0-Phase des Zellzykluses, und somit die Notwendigkeit der Expression des miR-181a/miR-181b-Clusters für die Aufrechterhaltung der Zellteilungsfähigkeit der APL-Zellen (Abb. 35 A). Unterstützt wird dies durch die Induktion des Cyclin D1-Proteins infolge der intrazellulären Erhöhung der miR-181a-

und miR-181b-Menge in NB4-Zellen durch microRNA-Mimics (Abb. 35 B). Durch die ektopische Expression von RASSF1A ohne funktionelle 3'UTR konnte der Beleg für die RASSF1A-Abhängigkeit der miR-181a- und miR-181b-vermittelten Induktion von Cyclin D1 experimentell belegt werden (Abb. 35 C).

Im Gegensatz zu ATRA resultiert die Behandlung mit As₂O₃ nicht in die Repression von Cyclin D1 (290). Dies wiederum unterstützt die bisherigen Beobachtungen, dass die Induktion der Apoptose mittels As₂O₃ keinen Einfluss auf die Expression des microRNA-Clusters und RASSF1A hat. Interessanterweise konnte bereits gezeigt werden, dass ATRA ebenso wie RASSF1A den JNK-*pathway* inhibiert (291), (253). Die As₂O₃-induzierte Apoptose in APL-Zellen hingegen ist mit der Induktion des JNK-*pathways* verbunden (292). Diese Daten unterstützen die Annahme, dass die RASSF1A-vermittelte Repression des Zellzykluses ein spezifischer Mechanismus der ATRA-induzierten Differenzierung von APL-Blasten ist. Schlussfolgernd scheint die zellzyklusinhibierende Funktion von RASSF1A ein wichtiger Faktor für die granulozytäre Differenzierung von APL-Blasten zu sein.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Dissertation das miR-181a/miR-181b-Cluster als ein wichtiger Faktor der PML/RAR α -assoziierten APL beschrieben werden. Dessen funktionelle Relevanz kommt durch die Repression des Tumorsuppressors RASSF1A und das damit verbundene Vorantreiben des Zellzykluses zum Tragen. Die Behandlung der APL-Zellen mit ATRA wiederum resultiert in die Repression des miR-181a/miR-181b-Clusters. Die damit verbundene Anreicherung des RASSF1A-Proteins wiederum führt zum Block des Zellzykluses und ist somit ein essentieller Bestandteil des ATRA-abhängigen Differenzierungsprozesses von APL-Zellen (Abb. 36).

Akute Promyelozytenleukämie - Zellzyklusprogress, Proliferation



Therapie-induzierte Granulopoese - Zellzyklusarrest, Differenzierung

Abbildung 36 Das miR-181a/miR-181b-Cluster und RASSF1A modulieren Differenzierung und Proliferation von APL-Zellen durch die Regulation von Cyclin D1.

Das onkogene Fusionsprotein PML/RAR α induziert die Expression von miR-181a und miR-181b. Beide microRNAs inhibieren die RASSF1A-Proteinsynthese. Dies wiederum fördert das Fortschreiten des Zellzykluses und die Proliferation durch die Akkumulation von Cyclin D1. Die Behandlung von APL-Blasten mit pharmakologischen Dosen ATRA führt zur Zerstörung von PML/RAR α , gefolgt von der Unterdrückung der miR-181a/b-Transkription *in vitro* und *in vivo*. Dies resultiert in der Wiederherstellung der RASSF1A-Proteinsynthese. RASSF1A wiederum fördert den Zellzyklusarrest und die Differenzierung durch die Inhibition der Cyclin D1-Akkumulation.

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Dissertation konnte dem miR-181a/miR-181b-Cluster eine Rolle in der PML/RAR α -assoziierten APL zugewiesen werden. Der Nachweis der funktionellen Relevanz des microRNA-Clusters für die Ausprägung der Krankheit wurde durch die Identifikation des Tumorsuppressors RASSF1A als ein Ziel des microRNA-Clusters und dessen Einbindung in die Zellzyklusregulation von APL-Zellen erbracht.

Neben den gewonnen Erkenntnissen bestehen im Hinblick auf die Relevanz und die Funktionalität des microRNA-Clusters sowie des Ziels RASSF1A weiterhin zu klärende Fragen. Es konnte die APL-spezifische und PML/RAR α -abhängige

Expression des microRNA-Clusters gezeigt werden. Der zugrunde liegende Mechanismus wurde jedoch nicht identifiziert. Hierfür bedarf es weiterer Untersuchungen, welche mögliche Interaktionspartner von PML/RAR α identifizieren, deren Modulierung in Abhängigkeit von PML/RAR α und ATRA einen Einfluss auf die miR-181a/miR-181b-Expression hat. Auf diesem Wege könnten auch weitere microRNAs identifiziert werden, welche durch denselben Regulationsmechanismus in die APL-Pathogenese involviert sein könnten. Des Weiteren könnten aufgrund der ebenfalls starken Expression von miR-181d funktionelle Untersuchungen zu einer möglichen Involvierung dieses miR-181-Mitgliedes in die APL-Pathogenese durchgeführt werden. Die Identifikation eines PML/RAR α -abhängigen Regulationsmechanismus des miR-181a/miR-181b-Clusters und die Untersuchung weiterer PML/RAR α -regulierter microRNAs und deren Ziele könnte somit zu einem tieferen Verständnis der APL-Entstehung beitragen.

Die im Rahmen der Dissertation durchgeführten funktionellen Untersuchungen wurden ausschließlich *in vitro* durchgeführt. Somit wäre die Untersuchung des miR-181a/miR-181b-Clusters in einem etablierten APL-Mausmodell (258), (293) für den Nachweis der biologischen Relevanz des microRNA-Clusters von hohem Interesse. Hier könnte die miR-181a/miR-181b-Expression in den murinen APL-Blasten durch den Einsatz von miR-181a- und miR-181b-spezifischen *Locked Nucleic Acids* (LNAs) reprimiert werden. Dadurch könnte der Ausbruch der Krankheit verzögert bzw. die APL-Blasten empfindlicher für therapeutische Agenzien gemacht werden. Dies wiederum könnte die Grundlage für die Entwicklung neuer weniger invasiver Therapieansätze für die Behandlung der APL sein.

Die gewonnen Erkenntnisse zur funktionellen Relevanz von RASSF1A während der ATRA-induzierten Differenzierung geben erste Hinweise auf die Funktionsweise des Tumorsuppressors in hämatopoetischen Zellen. Neben den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Arbeiten wurden bisher keine weiteren Studien im hämatopoetischen System durchgeführt. Jedoch konnten in diversen gesunden und vor allem malignen Geweben eine Vielzahl von Funktionen des Tumorsuppressors beschrieben werden (231), (222), (245). So könnten neben der Inhibierung von Cyclin D1 weitere RASSF1A-vermittelte Mechanismen während der Differenzierung der APL-Blasten von Bedeutung sein. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Reduktion der miR-181a/miR-181b-Menge neben der Induktion von

RASSF1A auch die Induktion des Zellzyklusregulators und Tumorsuppressors p53 zur Folge hat. Song et al. wiederum beschrieben die RASSF1A-vermittelte Stabilisierung von p53 durch die Zerstörung des p53-hemmenden Komplex MDM2-DAXX-HAUSP (256). In der APL wiederum führt PML/RAR α zum Abbau von p53 (294) und DAXX inhibiert als Korepressor von PML/RAR α (295) den ATRA-regulierten Transkriptionsfaktor C/EBP β (296). Diese Daten lassen somit vermuten, dass RASSF1A während der Differenzierung der APL-Blasten neben der Repression von Cyclin D1 durch die Stabilisierung von p53 zusätzlich regulierend in den Zellzyklus eingreifen könnte. In diesem Zusammenhang müssten noch weitere funktionelle Untersuchungen durchgeführt werden, welche einen möglichen regulatorischen Einfluss von RASSF1A auf die Stabilität von p53 aufzeigen. Zudem könnte äquivalent zum miR-181a/miR-181b-Cluster RASSF1A in einem APL-Mausmodell untersucht werden. Der Nachweis der biologischen Relevanz von RASSF1A *in vivo* würde die bisherigen *in vitro*-Daten untermauern und RASSF1A eine größere Bedeutung für die APL-Pathogenese zuweisen.

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Dissertation experimentelle Beweise für eine funktionelle Involvierung des miR-181a/miR-181b-Clusters in die akute Promyelozytenleukämie durch die Repression des Zellzyklusregulators RASSF1A erbracht werden. Diese Daten könnten als Grundlage für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Relevanz von RASSF1A im hämatopoetischen System dienen.

5 Zusammenfassung

Die akute Promyelozytenleukämie (APL) ist eine maligne Erkrankung des blutbildenden Systems und ist als ein Subtyp der akuten myeloischen Leukämie (AML) durch das onkogene Fusionsprotein PML/RAR α gekennzeichnet. Dieses führt durch die Rekrutierung von Korepressoren und Histondeactylasen zur transkriptionellen Stilllegung differenzierungsrelevanter Gene und somit zum Block der granulozytären Differenzierung im Stadium der Promyelozyten. Die Behandlung mit pharmakologischen Dosen all-trans Retinsäure (ATRA) führt zur Ausreifung der promyelozytischen Blasten zu funktionsfähigen Granulozyten und in Kombination mit Chemotherapie im Allgemeinen zur Heilung der Erkrankung. Am komplexen Prozess der Krankheitsentstehung der APL ist eine Vielzahl von Faktoren beteiligt. Unter ihnen befinden sich kleine nicht-proteinkodierende RNA-Moleküle, die microRNAs. Diverse Publikationen konnten dem microRNA-vermittelten posttranskriptionellen *silencing*-Mechanismus bereits eine bedeutende Rolle in der Differenzierung und Krebsentstehung zuweisen.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Repression des miR-181a/miR-181b-Clusters während der ATRA-abhängigen Differenzierung von APL-Blasten *in vitro* und *in vivo* beschrieben werden. Im APL-Zelllinienmodell und in PML/RAR α -*knock in*-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die miR-181a/miR-181b-Expression durch das onkogene Fusionsprotein PML/RAR α induziert wird. Der Nachweis einer erhöhten miR-181a- und miR-181b-Expression in primären APL-Patientenproben bestätigte diese Beobachtungen. Des Weiteren führte die Reduktion der miR-181a/miR-181b-Expression in der APL-Zelllinie NB4 zur Minderung der Koloniezahl und Proliferationsrate sowie zur Induktion von Apoptose. Mechanistische Untersuchungen belegten die direkte Bindung des microRNA-Clusters an die 3'UTR des Tumorsuppressors RASSF1A. Die Erhöhung der miR-181a/miR-181b-Menge und die shRNA-vermittelte Repression des Tumorsuppressors inhibieren die ATRA-induzierte Differenzierung von APL-Zellen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass dieser Prozess durch die RASSF1A-abhängige Repression des Zellzyklusregulators Cyclin D1 vermittelt wird. Des Weiteren wurde in APL-Patientenproben und in PML/RAR α -*knock in*-Mäusen eine erniedrigte RASSF1A-Proteinmenge nachgewiesen, wohingegen die Überexpression von RASSF1A zur Apoptose in APL-Zellen führt.

Zusammenfassend konnte RASSF1A als ein neuer ATRA-regulierter Faktor während der granulozytären Differenzierung von APL-Blasten identifiziert werden, der durch den miR-181a/miR-181b-vermittelten *silencing*-Prozess in die Pathogenese der PML/RAR α -abhängigen APL involviert ist.

6 Literaturverzeichnis

1. **Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL.** Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *American Journal of Pathology*. August 2006, S. 169(2):338-46.
2. **Rieger MA, Schroeder T.** Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Dezember 2012.
3. **Orkin SH, Zon LI.** Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. . Feb 2008 , S. 132(4):712. .
4. **Dick JE.** Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. Dezember 2008, S. 112(13):4793-807.
5. **Lawrie CH.** MicroRNAs in hematological malignancies. *Blood Rev*. Mai 2013, S. 27(3):143-54.
6. **Herold G.** Innere Medizin. 2015, S. 978-3-9814660-4-1 (ISBN).
7. **Brown CM, Larsen SR, Iland HJ, Joshua DE, Gibson J.** Leukaemias into the 21st century: part 1: the acute leukaemias. *Intern Med J*. Nov 2012 , S. 42(11):1179-86. .
8. **Gibson J, Iland HJ, Larsen SR, Brown CM, Joshua DE.** Leukaemias into the 21st century. Part 2: the chronic leukaemias. *Intern Med J*. Mai 2013 , S. 43(5):484-94. .
9. **Tenen DG.** Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer*. Feb 2003, S. 3(2):89-101. Review.
10. **Löwenberg B, Downing JR, Burnett A.** Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. Sep 1999, S. 341(14):1051-62.
11. **Deschler B, Lübbert M.** Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*. Nov 2006, S. 107(9):2099-107.
12. **Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C.** Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. . Aug 1976 , S. 33(4):451-8.
13. —. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. Oct 1985, S. 103(4):620-5.
14. —. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol*. . Jul 1991, S. 78(3):325-9.
15. **Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, Levine RL.** The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer*. Sep, 2012, 12(9):599-612. .
16. **Chen J, Odenike O, Rowley JD.** Leukaemogenesis: more than mutant genes. *Nat Rev Cancer*. Jan, 2010, 10(1):23-36.
17. **Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD.** The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. Oct 2002, S. 100(7):2292-302. Review.

18. **Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD.** The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. Jul 2009, S. 114(5):937-51.
19. **Yohe S.** Molecular Genetic Markers in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med*. Mar 2015, S. 4(3):460-78. doi: 10.3390/jcm4030460. Review.
20. **Dastugue N, Payen C, Lafage-Pochitaloff M, Bernard P, Leroux D, Huguet-Rigal F, Stoppa AM, Marit G, Molina L, Michallet M, et al.** Prognostic significance of karyotype in de novo adult acute myeloid leukemia. The BGMT group. *Leukemia*. Sep 1995, S. 9(9):1491-8.
21. **Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A.** The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*. Oct 1998, S. 92(7):2322-33.
22. **Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, Meijer J, van Oosterhoud S, van Putten WL, Valk PJ, Berna Beverloo H, Tenen DG, Löwenberg B, Delwel R.** Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. *Hematol J*. 2003, S. 4(1):31-40.
23. **Nerlov C.** C/EBPalpha mutations in acute myeloid leukaemias. *Nat Rev Cancer*. May 2004, S. 4(5):394-400.
24. **Fröhling S, Döhner H.** Disruption of C/EBPalpha function in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. Dec 2004, S. 351(23):2370-2.
25. **Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC, Carroll A, Pettenati MJ, Tantravahi R, Patil SR, Davey FR, Berg DT, Schiffer CA, Arthur DC, Mayer RJ.** Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res*. Sep 1998, S. 58(18):4173-9.
26. **Alsabeh R, Brynes RK, Slovak ML, Arber DA.** Acute myeloid leukemia with t(6;9) (p23;q34): association with myelodysplasia, basophilia, and initial CD34 negative immunophenotype. *Am J Clin Pathol*. Apr 1997, S. 107(4):430-7.
27. **Schoch C, Haase D, Haferlach T, Freund M, Link H, Lengfelder E, Löffler H, Büchner T, Fonatsch C.** Incidence and implication of additional chromosome aberrations in acute promyelocytic leukaemia with translocation t(15;17)(q22;q21): a report on 50 patients. *Br J Haematol*. Sep 1996, S. ;94(3):493-500.
28. **Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D,**

- Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD und LeukemiaNet., European.** Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. Jan, 2010, 115(3):453-74.
29. **Grimwade D, Mistry AR, Solomon E, Guidez F.** Acute promyelocytic leukemia: a paradigm for differentiation therapy. *Cancer Treat Res*. 2010, S. 145:219-35.
30. **Wang ZY, Chen Z.** Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood*. Mar 2008, S. 111(5):2505-15. .
31. **Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, Appelbaum FR, Feusner JH, Woods WG, Ogden A, Weinstein H, Shepherd L, Willman C, Bloomfield CD, Rowe JM, Wiernik PH.** All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: long-term outcome and prognostic factor analysis from the North American Intergroup protocol. *Blood*. Dec 2002, S. 100(13):4298-302. .
32. **Adès L, Guerci A, Raffoux E, Sanz M, Chevallier P, Lapusan S, Recher C, Thomas X, Rayon C, Castaigne S, Tournilhac O, de Botton S, Ifrah N, Cahn JY, Solary E, Gardin C, Fegeux N, Bordessoule D, Ferrant A, Meyer-Monard S, Vey N, Dombret H, Degos L, Chevret.** Very long-term outcome of acute promyelocytic leukemia after treatment with all-trans retinoic acid and chemotherapy: the European APL Group experience. *Blood*. Mar 2010, S. 115(9):1690-6.
33. **Jing J.** The PML-RARalpha fusion protein and targeted therapy for acute promyelocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. Apr, 2004, 45(4):639-48.
34. **Melnick A, Licht JD.** Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood*. May 1999, S. 93(10):3167-215.
35. **de Thé H, Chen Z.** Acute promyelocytic leukaemia: novel insights into the mechanisms of cure. *Nat Rev Cancer*. Nov 2010, S. 10(11):775-83. .
36. **Kakizuka A, Miller WH Jr, Umesono K, Warrell RP Jr, Frankel SR, Murty VV, Dmitrovsky E, Evans RM.** Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell*. Aug 1991, S. 66(4):663-74.
37. **de Thé H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A.** The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature*. 347(6293):558-61.. Oct 1990.
38. **Grignani F, Fagioli M, Alcalay M, Longo L, Pandolfi PP, Donti E, Biondi A, Lo Coco F, Grignani F, Pelicci PG.** Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment. *Blood*. Jan, Jan 1994, 83(1):10-25., S. 83(1):10-25.

39. **Kastner P, Lawrence HJ, Waltzinger C, Ghyselinck NB, Chambon P, Chan S.** Positive and negative regulation of granulopoiesis by endogenous RAR α . *Blood*. 2001, S. 97(5):1314-20.
40. **Lin RJ, Evans RM.** Acquisition of oncogenic potential by RAR chimeras in acute promyelocytic leukemia through formation of homodimers. *Mol Cell*. May 2000, S. (5):821-30.
41. **Minucci S, Maccarana M, Cioce M, De Luca P, Gelmetti V, Segalla S, Di Croce L, Giavara S, Matteucci C, Gobbi A, Bianchini A, Colombo E, Schiavoni I, Badaracco G, Hu X, Lazar MA, Landsberger N, Nervi C, Pelicci PG.** Oligomerization of RAR and AML1 transcription factors as a novel mechanism of oncogenic activation. *Mol Cell*. May 2000, S. (5):811-20.
42. **Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M, Fuks F, Lo Coco F, Kouzarides T, Nervi C, Minucci S, Pelicci PG.** Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science*. Feb 2002, S. 295(5557):1079-82.
43. **Saumet A, Vetter G, Bouttier M, Portales-Casamar E, Wasserman WW, Maurin T, Mari B, Barbry P, Vallar L, Friederich E, Arar K, Cassinat B, Chomienne C, Lecellier CH.** Transcriptional repression of microRNA genes by PML-RARA increases expression of key cancer proteins in acute promyelocytic leukemia. *Blood*. Jan, 2009, 113(2):412-21. .
44. **Hoemme C, Peerzada A, Behre G, Wang Y, McClelland M, Nieselt K, Zschunke M, Disselhoff C, Agrawal S, Isken F, Tidow N, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C.** Chromatin modifications induced by PML-RAR α repress critical targets in leukemogenesis as analyzed by ChIP-Chip. *Blood*. Mar, 2008, 111(5):2887-95. .
45. **Truong BT, Lee YJ, Lodie TA, Park DJ, Perrotti D, Watanabe N, Koeffler HP, Nakajima H, Tenen DG, Kogan SC.** CCAAT/Enhancer binding proteins repress the leukemic phenotype of acute myeloid leukemia. *Blood*. Feb, 2003, 101(3):1141-8.
46. **Seshire A, Rößiger T, Frech M, Beez S, Hagemeyer H, Puccetti E.** Direct interaction of PU.1 with oncogenic transcription factors reduces its serine phosphorylation and promoter binding. *Leukemia*. Jun, 2012, 26(6):1338-47. .
47. **Koken MH, Puvion-Dutilleul F, Guillemain MC, Viron A, Linares-Cruz G, Stuurman N, de Jong L, Szosteki C, Calvo F, Chomienne C, et al.** The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion. *EMBO J*. Mar 1994, S. 13(5):1073-83.
48. **Bernardi R, Pandolfi PP.** Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Dec 2007, S. (12):1006-16.
49. **Takahashi Y, Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, de Thé H.** PML nuclear bodies and apoptosis. *Oncogene*. Apr 2004, S. 23(16):2819-24.

50. **Insinga A, Monestiroli S, Ronzoni S, Carbone R, Pearson M, Pruneri G, Viale G, Appella E, Pelicci P, Minucci S.** Impairment of p53 acetylation, stability and function by an oncogenic transcription factor. *EMBO J.* Mar 2004, S. 23(5):1144-54.
51. **Pearson M, Carbone R, Sebastiani C, Cioce M, Fagioli M, Saito S, Higashimoto Y, Appella E, Minucci S, Pandolfi PP, Pelicci PG.** PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature.* Jul 2000, S. 406(6792):207-10.
52. **Cicalese A, Bonizzi G, Pasi CE, Faretta M, Ronzoni S, Giulini B, Brisken C, Minucci S, Di Fiore PP, Pelicci PG.** The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. *Cell.* Sep 2009, S. 138(6):1083-95. doi: 10.1016/j.cell.2009.06.048.
53. **Breitman TR, Collins SJ, Keene BR.** Terminal differentiation of human promyelocytic leukemic cells in primary culture in response to retinoic acid. *Blood.* 1981, S. 57(6):1000-4.
54. **Degos L, Dombret H, Chomienne C, Daniel MT, Micoléa JM, Chastang C, Castaigne S, Fenaux P.** All-trans-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 85(10):2643-53. . May 1995.
55. **Licht JD.** Reconstructing a disease: What essential features of the retinoic acid receptor fusion oncoproteins generate acute promyelocytic leukemia? *Cancer Cell.* Feb 2006, S. (2):73-4.
56. **Duprez E, Wagner K, Koch H, Tenen DG.** C/EBPbeta: a major PML-RARA-responsive gene in retinoic acid-induced differentiation of APL cells. *EMBO J.* Nov, 2003, 22(21):5806-16.
57. **Park DJ, Chumakov AM, Vuong PT, Chih DY, Gombart AF, Miller WH Jr, Koeffler HP.** CCAAT/enhancer binding protein epsilon is a potential retinoid target gene in acute promyelocytic leukemia treatment. *J Clin Invest.* May, 1999, 103(10):1399-408.
58. **Mueller BU, Pabst T, Fos J, Petkovic V, Fey MF, Asou N, Buergi U, Tenen DG.** ATRA resolves the differentiation block in t(15;17) acute myeloid leukemia by restoring PU.1 expression. *Blood.* Apr, 2006, 107(8):3330-8.
59. **Zhu J, Gianni M, Kopf E, Honoré N, Chelbi-Alix M, Koken M, Quignon F, Rochette-Egly C, de Thé H.** Retinoic acid induces proteasome-dependent degradation of retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and oncogenic RARalpha fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 1999, S. 96(26):14807-12.
60. **Nasr R, Guillemain MC, Ferhi O, Soilihi H, Peres L, Berthier C, Rousselot P, Robledo-Sarmiento M, Lallemand-Breitenbach V, Gournel B, Vitoux D, Pandolfi PP, Rochette-Egly C, Zhu J, de Thé H.** Eradication of acute promyelocytic leukemia-initiating cells through PML-RARA degradation. *Nat Med.* Dec 2008, S. 14(12):1333-42. .

61. **Weis K, Rambaud S, Lavau C, Jansen J, Carvalho T, Carmo-Fonseca M, Lamond A, Dejean A.** Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell*. Jan 1994, S. 76(2):345-56.
62. **Zhu J, Lallemand-Breitenbach V, de Thé H.** Pathways of retinoic acid- or arsenic trioxide-induced PML/RARalpha catabolism, role of oncogene degradation in disease remission. *Oncogene*. Oct 2001, S. 20(49):7257-65.
63. **Jeanne M, Lallemand-Breitenbach V, Ferhi O, Koken M, Le Bras M, Duffort S, Peres L, Berthier C, Soilihi H, Raught B, de Thé H.** PML/RARA oxidation and arsenic binding initiate the antileukemia response of As₂O₃. *Cancer Cell*. Jul 2010, S. 18(1):88-98.
64. **Chen GQ, Zhu J, Shi XG, Ni JH, Zhong HJ, Si GY, Jin XL, Tang W, Li XS, Xong SM, Shen ZX, Sun GL, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Gazin C, Naoe T, Chen SJ, Wang ZY, Chen Z.** In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As₂O₃ induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. *Blood*. Aug 1996, S. 88(3):1052-61.
65. **Watts JM, Tallman MS.** Acute promyelocytic leukemia: what is the new standard of care? *Blood Rev*. Sep, 2014, 28(5):205-12. .
66. **Guillemin MC, Raffoux E, Vitoux D, Kogan S, Soilihi H, Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Janin A, Daniel MT, Gourmel B, Degos L, Dombret H, Lanotte M, De Thé H.** In vivo activation of cAMP signaling induces growth arrest and differentiation in acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med*. Nov 2002, S. 196(10):1373-80.
67. **Muto A, Kizaki M, Kawamura C, Matsushita H, Fukuchi Y, Umezawa A, Yamada T, Hata J, Hozumi N, Yamato K, Ito M, Ueyama Y, Ikeda Y.** A novel differentiation-inducing therapy for acute promyelocytic leukemia with a combination of arsenic trioxide and GM-CSF. *Leukemia*. Aug 2001, S. 15(8):1176-84.
68. **Rogers JE, Yang D.** Differentiation syndrome in patients with acute promyelocytic leukemia. *J Oncol Pharm Pract*. Mar, 2012, 18(1):109-14.
69. **He L, Hannon GJ.** MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. Jul 2004, S. 5(7):522-31.
70. **Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ, Shimizu K.** MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J*. May 2011, S. 278(10):1598-609.
71. **Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V.** The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. Dec 1993, S. 75(5):843-54.
72. **Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G.** The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. Feb 2000, S. 403(6772):901-6.

73. **Wienholds E, Plasterk RH.** MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett.* Oct 2005, S. 579(26):5911-22.
74. **Lewis BP, Burge CB, Bartel DP.** Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* Jan 2005, S. 120(1):15-20.
75. **Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K, Lander ES, Kellis M.** Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature.* Mar 2005, S. 434(7031):338-45.
76. **Pasquinelli AE, Hunter S, Bracht J.** MicroRNAs: a developing story. *Curr Opin Genet Dev.* Apr 2005, S. 15(2):200-5. .
77. **Ambros, V.** MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell.* Jul 2003, S. 114(2):269. .
78. **Carrington, J. C. & Ambros, V.** Role of microRNAs in plant and animal development. *Science.* Jul 2003, S. 301(5631):336-8.
79. **McManus MT.** MicroRNAs and cancer. *Semin Cancer Biol.* Aug 2003, S. 13(4):253-8.
80. **Jansson MD, Lund AH.** MicroRNA and cancer. *Mol Oncol.* Dec 2012, S. (6):590-610.
81. **Garzon R, Calin GA, Croce CM.** MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med.* 2009, S. 60:167-79. .
82. **Malumbres M.** miRNAs and cancer: an epigenetics view. *Mol Aspects Med.* Jul-Aug 2013, S. 34(4):863-74.
83. **Kim VN, Nam JW.** Genomics of microRNA. *Trends Genet.* Mar 2006, S. 22(3):165-73. .
84. **Olena AF, Patton JG.** Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol.* Mar 2010, S. J Ce222(3):540-5.
85. **Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN.** MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* Oct 2004, S. 23(20):4051-60.
86. **Borchert GM, Lanier W, Davidson BL.** RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* Dec 2006, S. 13(12):1097-101. .
87. **Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR.** Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA.* Dec 2004, S. 10(12):1957-66.
88. **O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT.** c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature.* Jun 2005, S. 435(7043):839-43.
89. **Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sánchez-Céspedes M, Blanco D, Montuenga LM, Rossi S, Nicoloso MS, Faller WJ, Gallagher WM, Eccles SA, Croce CM, Esteller M.** A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 2008, S. 105(36):13556-61.

90. **Luciano DJ, Mirsky H, Vendetti NJ, Maas S.** RNA editing of a miRNA precursor. *RNA*. Aug 2004, S. 10(8):1174-7.
91. **Kawahara Y, Megraw M, Kreider E, Iizasa H, Valente L, Hatzigeorgiou AG, Nishikura K.** Frequency and fate of microRNA editing in human brain. *Nucleic Acids Res.* Sep 2008, S. 36(16):5270-80. .
92. **Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ.** Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. Nov 2004, S. 432(7014):231-5.
93. **Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R.** The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. Nov 2004, S. 432(7014):235-40. .
94. **Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN.** The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* Dec 1 2004, S. 18(24):3016-27. .
95. **Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN.** Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*. Jun 2006, S. 125(5):887-901.
96. **Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR.** Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* Dec 2003, S. 17(24):3011-6.
97. **Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R.** Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*. Nov 2005, S. 123(4):631-40.
98. **MacRae IJ, Ma E, Zhou M, Robinson CV, Doudna JA.** In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 2008, S. 105(2):512-7. .
99. **Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN.** The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* Feb 2006, S. 25(3):522-32.
100. **Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R.** TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. Aug 2005, S. 436(7051):740-4.
101. **Diederichs S, Haber DA.** Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*. Dec 2007, S. 131(6):1097-108.
102. **Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X.** Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*. Nov 2005, S. 123(4):621-9.
103. **Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD.** A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. Aug 2001, S. 293(5531):834-8.

104. **Salzman DW, Shubert-Coleman J, Furneaux H.** P68 RNA helicase unwinds the human let-7 microRNA precursor duplex and is required for let-7-directed silencing of gene expression. *J Biol Chem.* Nov 2007, S. 282(45):32773-9.
105. **Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD.** Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell.* Oct, 2003, 115(2):199-208.
106. **Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD.** Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell.* Oct, 2003, 115(2):209-16. .
107. **Bartel, DP.** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* Jan, 2004, 116(2):281-97.
108. **V., Ambros.** The functions of animal microRNAs. *Nature.* Sep, 2004, 431(7006):350-5. .
109. **VN., Kim.** Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol Cells.* . Feb, 2005 , 19(1):1-15. .
110. **Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB.** Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell.* Dec, 2003, 115(7):787-98.
111. **RA., Shivdasani.** MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood.* Dec, 2006 , 108(12):3646-53.
112. **Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ.** Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet.* Nov, 2003, 35(3):215-7. .
113. **Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S.** Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* Mar 2009, S. 11(3):228-34. .
114. **Garzon R, Croce CM.** MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Curr Opin Hematol.* Jul, 2008, 15(4):352-8. .
115. **Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP.** MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science.* Jan 2, 2004, 303(5654):83-6. .
116. **Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkeland SJ, Newman J, Bronson RT, Crowley D, Stone JR, Jaenisch R, Sharp PA, Jacks T.** Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell.* Mar, 2008, 132(5):875-86.
117. **Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J, Rajewsky N, Bender TP, Rajewsky K.** MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell.* Oct, 2007, 131(1):146-59.
118. **Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, van Dongen S, Grocock RJ, Das PP, Miska EA, Vetrie D, Okkenhaug K, Enright AJ, Dougan G, Turner**

- M, Bradley A.** Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*. Apr, 2007, 316(5824):608-11.
119. **Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, Iuliano R, Cimmino A, Aqeilan R, Volinia S, Bhatt D, Alder H, Marcucci G, Calin GA, Liu CG, Bloomfield CD, Andreeff M, Croce CM.** MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar, 2006, 103(13):5078-83. .
120. **Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F, Liuzzi F, Lulli V, Morsilli O, Santoro S, Valtieri M, Calin GA, Liu CG, Sorrentino A, Croce CM, Peschle C.** MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec, 2005, 102(50):18081-6.
121. **Surdziel E, Cabanski M, Dallmann I, Lyszkiewicz M, Krueger A, Ganser A, Scherr M, Eder M.** Enforced expression of miR-125b affects myelopoiesis by targeting multiple signaling pathways. *Blood*. Apr, 2011, 117(16):4338-48.
122. **Guo S, Lu J, Schlanger R, Zhang H, Wang JY, Fox MC, Purton LE, Fleming HH, Cobb B, Merckenschlager M, Golub TR, Scadden DT.** MicroRNA miR-125a controls hematopoietic stem cell number. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug, 2010, 107(32):14229-34. .
123. **Dixon-Mclver A, East P, Mein CA, Cazier JB, Molloy G, Chaplin T, Andrew Lister T, Young BD, Debernardi S.** Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia. *PLoS One*. May, 2008, 3(5):e2141.
124. **Zanette DL, Rivadavia F, Molfetta GA, Barbuzano FG, Proto-Siqueira R, Silva-Jr WA, Falcão RP, Zago MA.** miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. *Braz J Med Biol Res*. Nov, 2007, 40(11):1435-40.
125. **Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, Visentini M, Aqeilan R, Cimmino A, Wang H, Sun H, Volinia S, Alder H, Calin GA, Liu CG, Andreeff M, Croce CM.** MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*. Jun, 2007, 26(28):4148-57. .
126. **Laganà A, Russo F, Sismeiro C, Giugno R, Pulvirenti A, Ferro A.** Variability in the incidence of miRNAs and genes in fragile sites and the role of repeats and CpG islands in the distribution of genetic material. *PLoS One*. Jun, 2010, 5(6):e11166. .
127. **Lopez-Serra P, Esteller M.** DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer. *Oncogene*. Mar, 2012, 31(13):1609-22.
128. **Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM.** Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar, 2004, 101(9):2999-3004. .

129. **Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM.** Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov, 2002, 99(24):15524-9. .
130. **Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, Fabbri M, Coombes K, Alder H, Nakamura T, Flomenberg N, Marcucci G, Calin GA, Kornblau SM, Kantarjian H, Bloomfield CD, Andreeff M, Croce CM.** MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood.* Mar, 2008, 111(6):3183-9.
131. **Jongen-Lavrencic M, Sun SM, Dijkstra MK, Valk PJ, Löwenberg B.** MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood.* May, 2008, 111(10):5078-85.
132. **Li Z, Lu J, Sun M, Mi S, Zhang H, Luo RT, Chen P, Wang Y, Yan M, Qian Z, Neilly MB, Jin J, Zhang Y, Bohlander SK, Zhang DE, Larson RA, Le Beau MM, Thirman MJ, Golub TR, Rowley JD, Chen J.** Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct, 2008, 105(40):15535-40.
133. **Sun SM, Rockova V, Bullinger L, Dijkstra MK, Döhner H, Löwenberg B, Jongen-Lavrencic M.** The prognostic relevance of miR-212 expression with survival in cytogenetically and molecularly heterogeneous AML. *Leukemia.* Jan, 2013, 27(1):100-6. .
134. **Zhu YD, Wang L, Sun C, Fan L, Zhu DX, Fang C, Wang YH, Zou ZJ, Zhang SJ, Li JY, Xu W.** Distinctive microRNA signature is associated with the diagnosis and prognosis of acute leukemia. *Med Oncol.* Dec, 2012, 29(4):2323-31.
135. **Ventura A, Jacks T.** MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell.* Feb, 2009, 136(4):586-91.
136. **Ooi AG, Sahoo D, Adorno M, Wang Y, Weissman IL, Park CY.** MicroRNA-125b expands hematopoietic stem cells and enriches for the lymphoid-balanced and lymphoid-biased subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec, 2010, 107(50):21505-10.
137. **Zhao JL, Rao DS, Boldin MP, Taganov KD, O'Connell RM, Baltimore D.** NF-kappaB dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May, 2011, 108(22):9184-9. .
138. **O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Boldin MP, Taganov KD, Nicoll J, Paquette RL, Baltimore D.** Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med.* Mar, 2008, 205(3):585-94.
139. **Garzon R, Liu S, Fabbri M, Liu Z, Heaphy CE, Callegari E, Schwind S, Pang J, Yu J, Muthusamy N, Havelange V, Volinia S, Blum W, Rush LJ, Perrotti D, Andreeff M,**

- Bloomfield CD, Byrd JC, Chan K, Wu LC, Croce CM, Marcucci G.** MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood*. Jun, 2009, 113(25):6411-8. .
140. **Pulikkan JA, Dengler V, Peramangalam PS, Peer Zada AA, Müller-Tidow C, Bohlander SK, Tenen DG, Behre G.** Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia. *Blood*. Mar, 2010, 115(9):1768-78. .
141. **De Marchis ML, Ballarino M, Salvatori B, Puzzolo MC, Bozzoni I, Fatica A.** A new molecular network comprising PU.1, interferon regulatory factor proteins and miR-342 stimulates ATRA-mediated granulocytic differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. *Leukemia*. May, 2009, 23(5):856-62. .
142. **Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V, De Marchis ML, Nervi C, Bozzoni I.** A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell*. Dec, 2005, 123(5):819-31.
143. **Pelosi A, Careccia S, Lulli V, Romania P, Marziali G, Testa U, Lavorgna S, Lo-Coco F, Petti MC, Calabretta B, Levrero M, Piaggio G, Rizzo MG.** miRNA let-7c promotes granulocytic differentiation in acute myeloid leukemia. *Oncogene*. Aug, 2013, 32(31):3648-54.
144. **Zhang H, Luo XQ, Feng DD, Zhang XJ, Wu J, Zheng YS, Chen X, Xu L, Chen YQ.** MIR125B1 represses the degradation of the Upregulation of microRNA-125b contributes to leukemogenesis and increases drug resistance in pediatric acute promyelocytic leukemia. *Mol Cancer*. Sep, 2011, 10:108.
145. **Zhong H, Wang HR, Yang S, Zhong JH, Wang T, Wang C, Chen FY.** Targeting Smad4 links microRNA-146a to the TGF-beta pathway during retinoid acid induction in acute promyelocytic leukemia cell line. *Int J Hematol*. Jul, 2010, 92(1):129-35.
146. **Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z.** Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet*. Jul, 2005, 37(7):766-70.
147. **Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foà R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Müller RU, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien.** A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*. Jun, 2007, 129(7):1401-14.
148. **Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP.** Vertebrate microRNA genes. *Science*. Mar, 2003, 299(5612):1540.

149. **Saunders LR, Sharma AD, Tawney J, Nakagawa M, Okita K, Yamanaka S, Willenbring H, Verdin E.** miRNAs regulate SIRT1 expression during mouse embryonic stem cell differentiation and in adult mouse tissues. *Aging (Albany NY)*. Jul, 2010, 2(7):415-31.
150. **Redshaw N, Camps C, Sharma V, Motallebipour M, Guzman-Ayala M, Oikonomopoulos S, Thymiakou E, Ragoussis J, Episkopou V.** TGF- β /Smad2/3 signaling directly regulates several miRNAs in mouse ES cells and early embryos. *PLoS One*. 2013, 8(1):e55186.
151. **Xu Z, Jiang J, Xu C, Wang Y, Sun L, Guo X, Liu H.** MicroRNA-181 regulates CARM1 and histone arginine methylation to promote differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS One*. 2013, 8(1):e53146.
152. **Belkaya S, van Oers NS.** Transgenic expression of microRNA-181d augments the stress-sensitivity of CD4(+)CD8(+) thymocytes. *PLoS One*. Jan, 2014, 9(1):e85274.
153. **Liu G, Min H, Yue S, Chen CZ.** Pre-miRNA loop nucleotides control the distinct activities of mir-181a-1 and mir-181c in early T cell development. *PLoS One*. 2008, 3(10):e3592.
154. **Xue Q, Guo ZY, Li W, Wen WH, Meng YL, Jia LT, Wang J, Yao LB, Jin BQ, Wang T, Yang AG.** Human activated CD4(+) T lymphocytes increase IL-2 expression by downregulating microRNA-181c. *Mol Immunol*. Jan, 2011, 48(4):592-9. .
155. **Schaffert SA, Loh C, Wang S, Arnold CP, Axtell RC, Newell EW, Nolan G, Ansel KM, Davis MM, Steinman L, Chen CZ.** mir-181a-1/b-1 Modulates Tolerance through Opposing Activities in Selection and Peripheral T Cell Function. *J Immunol*. Aug, 2015, 195(4):1470-9. .
156. **Li QJ, Chau J, Ebert PJ, Sylvester G, Min H, Liu G, Braich R, Manoharan M, Soutschek J, Skare P, Klein LO, Davis MM, Chen CZ.** miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell*. Apr, 2007, 129(1):147-61.
157. **Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Polesskaya A, Ait-Si-Ali S, Groisman R, Souidi M, Cuvellier S, Harel-Bellan A.** The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat Cell Biol*. Mar, 2006, 8(3):278-84.
158. **Wang H, Li J1, Chi H1, Zhang F1, Zhu X1, Cai J1, Yang X1.** MicroRNA-181c targets Bcl-2 and regulates mitochondrial morphology in myocardial cells. *J Cell Mol Med*. . Sep, 2015, 19(9):2084-97. .
159. **Yap CS, Sinha RA, Ota S, Katsuki M, Yen PM.** Thyroid hormone negatively regulates CDX2 and SOAT2 mRNA expression via induction of miRNA-181d in hepatic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Nov, 2013, 440(4):635-9.

160. **Zhao J, Gong AY, Zhou R, Liu J, Eischeid AN, Chen XM.** Downregulation of PCAF by miR-181a/b provides feedback regulation to TNF- α -induced transcription of proinflammatory genes in liver epithelial cells. *J Immunol.* Feb, 2012, 188(3):1266-74.
161. **Bhushan R, Grünhagen J, Becker J, Robinson PN, Ott CE, Knaus P.** miR-181a promotes osteoblastic differentiation through repression of TGF- β signaling molecules. *Int J Biochem Cell Biol.* Mar, 2013, 45(3):696-705.
162. **Ouyang YB, Lu Y, Yue S, Giffard RG.** miR-181 targets multiple Bcl-2 family members and influences apoptosis and mitochondrial function in astrocytes. *Mitochondrion.* Mar, 2012, 12(2):213-9.
163. **Cai B, An Y, Lv N, Chen J, Tu M, Sun J, Wu P, Wei J, Jiang K, Miao Y.** miRNA-181b increases the sensitivity of pancreatic ductal adenocarcinoma cells to gemcitabine in vitro and in nude mice by targeting BCL-2. *Oncol Rep.* May, 2013, 29(5):1769-76.
164. **Song J, Lee M, Kim D, Han J, Chun CH, Jin EJ.** MicroRNA-181b regulates articular chondrocytes differentiation and cartilage integrity. *Biochem Biophys Res Commun.* Feb, 2013, 431(2):210-4.
165. **Sun X, Icli B, Wara AK, Belkin N, He S, Kobzik L, Hunninghake GM, Vera MP und MICU Registry, Blackwell TS, Baron RM, Feinberg MW.** MicroRNA-181b regulates NF- κ B-mediated vascular inflammation. *J Clin Invest.* Jun, 2012, 122(6):1973-90.
166. **Iliopoulos D, Jaeger SA, Hirsch HA, Bulyk ML, Struhl K.** STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer. *Mol Cell.* Aug, 2010, 39(4):493-506.
167. **Merkerova M, Belickova M, Bruchova H.** Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. *Eur J Haematol.* Oct, 2008, 81(4):304-10. .
168. **Ramkissoon SH1, Mainwaring LA, Ogasawara Y, Keyvanfar K, McCoy JP Jr, Sloand EM, Kajigaya S, Young NS.** Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. *Leuk Res.* May, 2006, 30(5):643-7.
169. **Choong ML, Yang HH, McNiece I.** MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis. *Exp Hematol.* Apr, 2007, 35(4):551-64.
170. **Su R, Lin HS, Zhang XH, Yin XL, Ning HM, Liu B, Zhai PF, Gong JN, Shen C, Song L, Chen J, Wang F, Zhao HL, Ma YN, Yu J, Zhang JW.** MiR-181 family: regulators of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia as well as potential therapeutic targets. *Oncogene.* Jun, 2015, 34(25):3226-39.
171. **Cuesta R, Martínez-Sánchez A, Gebauer F.** miR-181a regulates cap-dependent translation of p27(kip1) mRNA in myeloid cells. *Mol Cell Biol.* . May, 2009, 29(10):2841-51.

172. **Li X, Zhang J, Gao L, McClellan S, Finan MA, Butler TW, Owen LB, Piazza GA, Xi Y.** MiR-181 mediates cell differentiation by interrupting the Lin28 and let-7 feedback circuit. *Cell Death Differ.* Mar, 2012, 19(3):378-86. .
173. **Cichocki F, Felices M, McCullar V, Presnell SR, Al-Attar A, Lutz CT, Miller JS.** Cutting edge: microRNA-181 promotes human NK cell development by regulating Notch signaling. *J Immunol.* Dec, 2011, 187(12):6171-5. .
174. **Tan LP, Wang M, Robertus JL, Schakel RN, Gibcus JH, Diepstra A, Harms G, Peh SC, Reijmers RM, Pals ST, Kroesen BJ, Kluin PM, Poppema S, van den Berg A.** miRNA profiling of B-cell subsets: specific miRNA profile for germinal center B cells with variation between centroblasts and centrocytes. *Lab Invest.* Jun, 2009, 89(6):708-16. .
175. **Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM, Farace MG.** Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun.* Sep, 2005, 334(4):1351-8.
176. **Ruan J, Lou S, Dai Q, Mao D, Ji J, Sun X.** Tumor suppressor miR-181c attenuates proliferation, invasion, and self-renewal abilities in glioblastoma. *Neuroreport.* Jan, 2015, 26(2):66-73. .
177. **Wang XF, Shi ZM, Wang XR, Cao L, Wang YY, Zhang JX, Yin Y, Luo H, Kang CS, Liu N, Jiang T, You YP.** MiR-181d acts as a tumor suppressor in glioma by targeting K-ras and Bcl-2. *J Cancer Res Clin Oncol.* Apr, 2012, 138(4):573-84. .
178. **Shi L, Cheng Z, Zhang J, Li R, Zhao P, Fu Z, You Y.** hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Res.* Oct, 2008, 1236:185-93. .
179. **Wang B, Hsu SH, Majumder S, Kutay H, Huang W, Jacob ST, Ghoshal K.** TGFbeta-mediated upregulation of hepatic miR-181b promotes hepatocarcinogenesis by targeting TIMP3. *Oncogene.* Mar, 2010, 29(12):1787-97. .
180. **Zou C, Li Y, Cao Y, Zhang J, Jiang J, Sheng Y, Wang S, Huang A, Tang H.** Up-regulated MicroRNA-181a induces carcinogenesis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by targeting E2F5. *BMC Cancer.* Feb, 2014, 14:97.
181. **Shin KH, Bae SD, Hong HS, Kim RH, Kang MK, Park NH.** miR-181a shows tumor suppressive effect against oral squamous cell carcinoma cells by downregulating K-ras. *Biochem Biophys Res Commun.* Jan, 2011, 404(4):896-902.
182. **Ji D, Chen Z, Li M, Zhan T, Yao Y, Zhang Z, Xi J, Yan L, Gu J.** MicroRNA-181a promotes tumor growth and liver metastasis in colorectal cancer by targeting the tumor suppressor WIF-1. *Mol Cancer.* Apr, 2014, 13:86.
183. **Zhang WL, Zhang JH.** miR-181c promotes proliferation via suppressing PTEN expression in inflammatory breast cancer. *Int J Oncol.* May, 2015, 46(5):2011-20.

184. **Lu Y, Roy S, Nuovo G, Ramaswamy B, Miller T, Shapiro C, Jacob ST, Majumder S.** Anti-microRNA-222 (anti-miR-222) and -181B suppress growth of tamoxifen-resistant xenografts in mouse by targeting TIMP3 protein and modulating mitogenic signal. *J Biol Chem.* Dec, 2011, 286(49):42292-302. .
185. **Chen L, Yang Q, Kong WQ, Liu T, Liu M, Li X, Tang H.** MicroRNA-181b targets cAMP responsive element binding protein 1 in gastric adenocarcinomas. *IUBMB Life.* Jul, 2012, 64(7):628-35.
186. **Hashimoto Y, Akiyama Y, Otsubo T, Shimada S, Yuasa Y.** Involvement of epigenetically silenced microRNA-181c in gastric carcinogenesis. *Carcinogenesis.* May, 2010, 31(5):777-84.
187. **Zhang X, Nie Y, Du Y, Cao J, Shen B, Li Y.** MicroRNA-181a promotes gastric cancer by negatively regulating tumor suppressor KLF6. *Tumour Biol.* Oct, 2012, 33(5):1589-97.
188. **Liang J, Li X, Li Y, Wei J, Daniels G, Zhong X, Wang J, Sfanos K, Melamed J, Zhao J, Lee P.** LEF1 targeting EMT in prostate cancer invasion is mediated by miR-181a. *Am J Cancer Res.* . Feb, 2015 , 5(3):1124-32.
189. **He L, Yao H, Fan LH, Liu L, Qiu S, Li X, Gao JP, Hao CQ.** MicroRNA-181b expression in prostate cancer tissues and its influence on the. *Genet Mol Res.* Apr, 2013, 12(2):1012-21.
190. **Gao W, Yu Y, Cao H, Shen H, Li X, Pan S, Shu Y.** Deregulated expression of miR-21, miR-143 and miR-181a in non small cell lung cancer is related to clinicopathologic characteristics or patient prognosis. *Biomed Pharmacother.* Jul, 2010, 64(6):399-408.
191. **Zhu W, Shan X, Wang T, Shu Y, Liu P.** miR-181b modulates multidrug resistance by targeting BCL2 in human cancer cell lines. *Int J Cancer.* Dec, 2010, 127(11):2520-9.
192. **Liu J, Xu D, Wang Q, Zheng D, Jiang X, Xu L.** LPS induced miR-181a promotes pancreatic cancer cell migration via targeting PTEN and MAP2K4. *Dig Dis Sci.* Jul, 2014, 59(7):1452-60. .
193. **Takiuchi D, Eguchi H, Nagano H, Iwagami Y, Tomimaru Y, Wada H, Kawamoto K, Kobayashi S, Marubashi S, Tanemura M, Mori M, Doki Y.** Involvement of microRNA-181b in the gemcitabine resistance of pancreatic cancer. *Pancreatology.* Sep-Oct, 2013, 13(5):517-23.
194. **Ikeda Y, Tanji E, Makino N, Kawata S, Furukawa T.** MicroRNAs associated with mitogen-activated protein kinase in human pancreatic cancer. *Mol Cancer Res.* Feb, 2012, 10(2):259-69.
195. **Chen Y, Ke G, Han D, Liang S, Yang G, Wu X.** MicroRNA-181a enhances the chemoresistance of human cervical squamous cell carcinoma to cisplatin by targeting PRKCD. *Exp Cell Res.* Jan, 2014, 320(1):12-20.

196. **Yang L, Wang YL, Liu S, Zhang PP, Chen Z, Liu M, Tang H.** miR-181b promotes cell proliferation and reduces apoptosis by repressing the expression of adenylyl cyclase 9 (AC9) in cervical cancer cells. *FEBS Lett.* Jan, 2014, 588(1):124-30.
197. **Pons A, Nomdedeu B, Navarro A, Gaya A, Gel B, Diaz T, Valera S, Rozman M, Belkaid M, Montserrat E, Monzo M.** Hematopoiesis-related microRNA expression in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma.* Nov, 2009, 50(11):1854-9. .
198. **Pichiorri F, Suh SS, Ladetto M, Kuehl M, Palumbo T, Drandi D, Taccioli C, Zanasi N, Alder H, Hagan JP, Munker R, Volinia S, Boccadoro M, Garzon R, Palumbo A, Aqeilan RI, Croce CM.** MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep, 2008, 105(35):12885-90. .
199. **Lwin T, Lin J, Choi YS, Zhang X, Moscinski LC, Wright KL, Sotomayor EM, Dalton WS, Tao J.** Follicular dendritic cell-induced microRNA-mediated follicular dendritic cell-dependent drug resistance of non-Hodgkin lymphoma involves cell adhesion-mediated Bim down-regulation through induction of microRNA-181a. *Blood.* Dec, 2010, 116(24):5228-36. .
200. **Fei J, Li Y, Zhu X, Luo X.** miR-181a post-transcriptionally downregulates oncogenic RalA and contributes to growth inhibition and apoptosis in chronic myelogenous leukemia (CML). *PLoS One.* 2012, 7(3):e32834.
201. **Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, Volinia S, Alder H, Liu CG, Rassenti L, Calin GA, Hagan JP, Kipps T, Croce CM.** Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res.* Dec, 2006, 66(24):11590-3.
202. **Pallasch CP, Patz M, Park YJ, Hagist S, Eggle D, Claus R, Debey-Pascher S, Schulz A, Frenzel LP, Claasen J, Kutsch N, Krause G, Mayr C, Rosenwald A, Plass C, Schultze JL, Hallek M, Wendtner CM.** miRNA deregulation by epigenetic silencing disrupts suppression of the oncogene PLAG1 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* Oct, 2009, 114(15):3255-64.
203. **Debernardi S, Skoulakis S, Molloy G, Chaplin T, Dixon-McIver A, Young BD.** MicroRNA miR-181a correlates with morphological sub-class of acute myeloid leukaemia and the expression of its target genes in global genome-wide analysis. *Leukemia.* May, 2007, 21(5):912-6. .
204. **Isken F, Steffen B, Merk S, Dugas M, Markus B, Tidow N, Zühlendorf M, Illmer T, Thiede C, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C.** Identification of acute myeloid leukaemia associated microRNA expression patterns. *Br J Haematol.* Jan, 2008, 140(2):153-61. .
205. **Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Vukosavljevic T, Paschka P, Whitman SP, Langer C, Baldus CD, Liu CG, Ruppert AS, Powell BL, Carroll AJ, Caligiuri MA, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD.** Prognostic significance of, and gene

and microRNA expression signatures associated with, CEBPA mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with high-risk molecular features: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol.* Nov, 2008, 26(31):5078-87. .

206. **Hickey CJ, Schwind S, Radomska HS, Dorrance AM, Santhanam R, Mishra A, Wu YZ, Alachkar H, Maharry K, Nicolet D, Mrózek K, Walker A, Eiring AM, Whitman SP, Becker H, Perrotti D, Wu LC, Zhao X, Fehniger TA, Vij R, Byrd JC, Blum W, Lee LJ, Caligiuri MA, Bloo.** Lenalidomide-mediated enhanced translation of C/EBP α -p30 protein up-regulates expression of the antileukemic microRNA-181a in acute myeloid leukemia. *Blood.* Jan, 2013, 121(1):159-69. .

207. **Marcucci G, Radmacher MD, Maharry K, Mrózek K, Ruppert AS, Paschka P, Vukosavljevic T, Whitman SP, Baldus CD, Langer C, Liu CG, Carroll AJ, Powell BL, Garzon R, Croce CM, Kolitz JE, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD.** MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* May, 2008, 358(18):1919-28.

208. **Schwind S, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Holland KB, Margeson D, Whitman SP, Hickey C, Becker H, Metzeler KH, Paschka P, Baldus CD, Liu S, Garzon R, Powell BL, Kolitz JE, Carroll AJ, Caligiuri MA, Larson RA, Marcucci G, Bloomfield CD.** Prognostic significance of expression of a single microRNA, miR-181a, in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol.* Dec, 2010, 28(36):5257-64. .

209. **Li Z, Huang H, Li Y, Jiang X, Chen P, Arnovitz S, Radmacher MD, Maharry K, Elkahloun A, Yang X, He C, He M, Zhang Z, Dohner K, Neilly MB, Price C, Lussier YA, Zhang Y, Larson RA, Le Beau MM, Caligiuri MA, Bullinger L, Valk PJ, Delwel R, Lowenberg B, Liu.** Up-regulation of a HOXA-PBX3 homeobox-gene signature following down-regulation of miR-181 is associated with adverse prognosis in patients with cytogenetically abnormal AML. *Blood.* Mar, 2012, 119(10):2314-24.

210. **Lu F, Zhang J, Ji M, Li P, Du Y, Wang H, Zang S, Ma D, Sun X, Ji C.** miR-181b increases drug sensitivity in acute myeloid leukemia via targeting HMGB1 and Mcl-1. *Int J Oncol.* Jul, 2014, 45(1):383-92. .

211. **Bai H, Cao Z, Deng C, Zhou L, Wang C.** miR-181a sensitizes resistant leukaemia HL-60/Ara-C cells to Ara-C by inducing apoptosis. *J Cancer Res Clin Oncol.* Apr, 2012, 138(4):595-602.

212. **Careccia S, Mainardi S, Pelosi A, Gurtner A, Diverio D, Riccioni R, Testa U, Pelosi E, Piaggio G, Sacchi A, Lavorgna S, Lo-Coco F, Blandino G, Levrero M, Rizzo MG.** A restricted signature of miRNAs distinguishes APL blasts from normal promyelocytes. *Oncogene.* Nov, 2009, 28(45):4034-40.

213. **Wang X, Gocek E, Liu CG, Studzinski GP.** MicroRNAs181 regulate the expression of p27Kip1 in human myeloid leukemia cells induced to differentiate by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Cell Cycle*. Mar , 2009, 8(5):736-41. .
214. **Weng H, Lal K, Yang FF, Chen J.** The pathological role and prognostic impact of miR-181 in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet*. May, 2015, 208(5):225-9.
215. **Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP.** Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet*. Jul, 2000, 25(3):315-9.
216. **Dallol A, Agathangelou A, Fenton SL, Ahmed-Choudhury J, Hesson L, Vos MD, Clark GJ, Downward J, Maher ER, Latif F.** RASSF1A interacts with microtubule-associated proteins and modulates microtubule dynamics. *Cancer Res*. Jun, 2004, 64(12):4112-6.
217. **Dallol A, Agathangelou A, Tommasi S, Pfeifer GP, Maher ER, Latif F.** Involvement of the RASSF1A tumor suppressor gene in controlling cell migration. *Cancer Res*. Sep, 2005, 65(17):7653-9.
218. **Amaar YG, Minera MG, Hatran LK, Strong DD, Mohan S, Reeves ME.** Ras association domain family 1C protein stimulates human lung cancer cell proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Dec, 2006, 291(6):L1185-90. .
219. **Reeves ME, Baldwin SW, Baldwin ML, Chen ST, Moretz JM, Aragon RJ, Li X, Strong DD, Mohan S, Amaar YG.** Ras-association domain family 1C protein promotes breast cancer cell migration and attenuates apoptosis. *BMC Cancer*. Oct, 2010, 10:562.
220. **Amaar YG, Baylink DJ, Mohan S.** Ras-association domain family 1 protein, RASSF1C, is an IGFBP-5 binding partner and a potential regulator of osteoblast cell proliferation. *J Bone Miner Res*. Aug, 2005, 20(8):1430-9. .
221. **Gordon M, Baksh S.** RASSF1A: Not a prototypical Ras effector. *Small GTPases*. May, 2011, 2(3):148-157.
222. **Richter AM, Pfeifer GP, Dammann RH.** The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization. *Biochim Biophys Acta*. Dec, 2009 , 1796(2):114-28. .
223. **Burbee DG, Forgacs E, Zöchbauer-Müller S, Shivakumar L, Fong K, Gao B, Randle D, Kondo M, Virmani A, Bader S, Sekido Y, Latif F, Milchgrub S, Toyooka S, Gazdar AF, Lerman MI, Zabarovsky E, White M, Minna JD.** Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst*. May, 2001, 93(9):691-9.
224. **Pfeifer GP, Dammann R.** Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. *Biochemistry (Mosc)*. May, 2005, 70(5):576-83. .

225. **Grote HJ, Schmiemann V, Geddert H, Bocking A, Kappes R, Gabbert HE, Sarbia M.** Methylation of RAS association domain family protein 1A as a biomarker of lung cancer. *Cancer*. Apr, 2006, 108(2):129-34.
226. **Yeo W, Wong WL, Wong N, Law BK, Tse GM, Zhong S.** High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in tumorous and non-tumorous tissue of breast cancer. *Pathology*. Apr, 2005, 37(2):125-30.
227. **Chan MW, Chan LW, Tang NL, Lo KW, Tong JH, Chan AW, Cheung HY, Wong WS, Chan PS, Lai FM, To KF.** Frequent hypermethylation of promoter region of RASSF1A in tumor tissues and voided urine of urinary bladder cancer patients. *Int J Cancer*. May, 2003, 104(5):611-6.
228. **Yu MY, Tong JH, Chan PK, Lee TL, Chan MW, Chan AW, Lo KW, To KF.** Hypermethylation of the tumor suppressor gene RASSF1A and frequent concomitant loss of heterozygosity at 3p21 in cervical cancers. *Int J Cancer*. Jun, 2003, 105(2):204-9.
229. **Pan ZG, Kashuba VI, Liu XQ, Shao JY, Zhang RH, Jiang JH, Guo C, Zabarovsky E, Ernberg I, Zeng YX.** High frequency somatic mutations in RASSF1A in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biol Ther*. Oct, 2005, 4(10):1116-22. .
230. **Meng F, Glaser SS, Francis H, DeMorrow S, Han Y, Passarini JD, Stokes A, Cleary JP, Liu X, Venter J, Kumar P, Priester S, Hubble L, Staloch D, Sharma J, Liu CG, Alpini G.** Functional analysis of microRNAs in human hepatocellular cancer stem cells. *J Cell Mol Med*. Jan, 2012, 16(1):160-73.
231. **Donninger H, Vos MD, Clark GJ.** The RASSF1A tumor suppressor. *J Cell Sci*. Sep, 2007, 120(Pt 18):3163-72. .
232. **Griffiths EA, Gore SD, Hooker C, McDevitt MA, Karp JE, Smith BD, Mohammad HP, Ye Y, Herman JG, Carraway HE.** Acute myeloid leukemia is characterized by Wnt pathway inhibitor promoter hypermethylation. *Leuk Lymphoma*. Sep, 2010, 51(9):1711-9.
233. **Johan MF, Bowen DT, Frew ME, Goodeve AC, Reilly JT.** Aberrant methylation of the negative regulators RASSF1A, SHP-1 and SOCS-1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. Apr, 2005, 129(1):60-5.
234. **Zare-Abdollahi D, Safari S, Movafagh A, Ghadiani M, Riazi-Isfahani S, Omrani MD.** Intact expression status of RASSF1A in acute myeloid leukemia. *Med Oncol*. Jan, 2014, 31(1):770. .
235. **Dreijerink K, Braga E, Kuzmin I, Geil L, Duh FM, Angeloni D, Zbar B, Lerman MI, Stanbridge EJ, Minna JD, Protopopov A, Li J, Kashuba V, Klein G, Zabarovsky ER.** The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun, 2001, 98(13):7504-9. .

236. **Kuzmin I, Gillespie JW, Protopopov A, Geil L, Dreijerink K, Yang Y, Vocke CD, Duh FM, Zabarovsky E, Minna JD, Rhim JS, Emmert-Buck MR, Linehan WM, Lerman MI.** The RASSF1A tumor suppressor gene is inactivated in prostate tumors and suppresses growth of prostate carcinoma cells. *Cancer Res.* Jun, 2002, 62(12):3498-502.
237. **Tommasi S, Dammann R, Zhang Z, Wang Y, Liu L, Tsark WM, Wilczynski SP, Li J, You M, Pfeifer GP.** Tumor susceptibility of Rassf1a knockout mice. *Cancer Res.* Jan, 2005, 65(1):92-8.
238. **van der Weyden L, Tachibana KK, Gonzalez MA, Adams DJ, Ng BL, Petty R, Venkitaraman AR, Arends MJ, Bradley A.** The RASSF1A isoform of RASSF1 promotes microtubule stability and suppresses tumorigenesis. *Mol Cell Biol.* Sep, 2005, 25(18):8356-67.
239. **Vos MD, Ellis CA, Bell A, Birrer MJ, Clark GJ.** Ras uses the novel tumor suppressor RASSF1 as an effector to mediate apoptosis. *J Biol Chem.* 2000, S. 275(46):35669-72.
240. **Avruch J, Xavier R, Bardeesy N, Zhang XF, Praskova M, Zhou D, Xia F.** Rassf family of tumor suppressor polypeptides. *J Biol Chem.* Apr, 2009, 284(17):11001-5.
241. **Hamilton G, Yee KS, Scrace S, O'Neill E.** ATM regulates a RASSF1A-dependent DNA damage response. *Curr Biol.* Dec, 2009, 19(23):2020-5. .
242. **Rong R, Jiang LY, Sheikh MS, Huang Y.** Mitotic kinase Aurora-A phosphorylates RASSF1A and modulates RASSF1A-mediated microtubule interaction and M-phase cell cycle regulation. *Oncogene.* Dec, 2007, 26(55):7700-8.
243. **Vichalkovski A, Gresko E, Cornils H, Hergovich A, Schmitz D, Hemmings BA.** NDR kinase is activated by RASSF1A/MST1 in response to Fas receptor stimulation and promotes apoptosis. *Curr Biol.* Dec, 2008, 18(23):1889-95. .
244. **Jiang L, Rong R, Sheikh MS, Huang Y.** Mitotic arrest by tumor suppressor RASSF1A is regulated via CHK1 phosphorylation. *Mol Cancer Res.* Jan, 2014, 12(1):119-29. .
245. **Agathangelou A, Cooper WN, Latif F.** Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Research.* 15. January 2005, S. 67(2):492-500.
246. **Song MS1, Song SJ, Ayad NG, Chang JS, Lee JH, Hong HK, Lee H, Choi N, Kim J, Kim H, Kim JW, Choi EJ, Kirschner MW, Lim DS.** The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex. *Nat Cell Biol.* Feb, 2004, 6(2):129-37.
247. **Vos MD, Martinez A, Elam C, Dhallo A, Taylor BJ, Latif F, Clark GJ.** A role for the RASSF1A tumor suppressor in the regulation of tubulin polymerization and genomic stability. *Cancer Res.* Jun, 2004, 64(12):4244-50.

248. **Vos MD, Dallol A, Eckfeld K, Allen NP, Donninger H, Hesson LB, Calvisi D, Latif F, Clark GJ.** The RASSF1A tumor suppressor activates Bax via MOAP-1. *J Biol Chem.* Feb, 2006, 281(8):4557-63. .
249. **Baksh S, Tommasi S, Fenton S, Yu VC, Martins LM, Pfeifer GP, Latif F, Downward J, Neel BG.** The tumor suppressor RASSF1A and MAP-1 link death receptor signaling to Bax conformational change and cell death. *Mol Cell.* Jun, 2005, 18(6):637-50.
250. **Liu L, Tommasi S, Lee DH, Dammann R, Pfeifer GP.** Control of microtubule stability by the RASSF1A tumor suppressor. *Oncogene.* Nov, 2003, 22(50):8125-36.
251. **Song MS, Chang JS, Song SJ, Yang TH, Lee H, Lim DS.** The centrosomal protein RAS association domain family protein 1A (RASSF1A)-binding protein 1 regulates mitotic progression by recruiting RASSF1A to spindle poles. *J Biol Chem.* Feb, 2005, 280(5):3920-7.
252. **Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, Pestell R, White MA.** The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Mol Cell Biol.* 2002, S. 22(12):4309-18.
253. **Whang YM, Kim YH, Kim JS, Yoo YD.** RASSF1A suppresses the c-Jun-NH2-kinase pathway and inhibits cell cycle progression. *Cancer Res.* May, 2005, 65(9):3682-90.
254. **Fenton SL, Dallol A, Agathangelou A, Hesson L, Ahmed-Choudhury J, Baksh S, Sardet C, Dammann R, Minna JD, Downward J, Maher ER, Latif F.** Identification of the E1A-regulated transcription factor p120 E4F as an interacting partner of the RASSF1A candidate tumor suppressor gene. *Cancer Res.* Jan, 2004, 64(1):102-7.
255. **Fajas L, Paul C, Vié A, Estrach S, Medema R, Blanchard JM, Sardet C, Vignais ML.** Cyclin A is a mediator of p120E4F-dependent cell cycle arrest in G1. *Mol Cell Biol.* Apr, 2001, 21(8):2956-66.
256. **Song MS, Song SJ, Kim SY, Oh HJ, Lim DS.** The tumour suppressor RASSF1A promotes MDM2 self-ubiquitination by disrupting the MDM2-DAXX-HAUSP complex. *EMBO J.* Jul, 2008, 27(13):1863-74.
257. **Grignani F, Ferrucci PF, Testa U, Talamo G, Fagioli M, Alcalay M, Mencarelli A, Peschle C, Nicoletti I, Pelicci PG.** The acute promyelocytic leukaemia specific PML/RAR α fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. *Cell* . 1993, S. 74:423.
258. **Westervelt P, Lane AA, Pollock JL, Oldfather K, Holt MS, Zimonjic DB, Popescu NC, DiPersio JF, Ley TJ.** High-penetrance mouse model of acute promyelocytic leukemia with very low levels of PML-RAR α expression. *Blood.* Sep, 2003, 102(5):1857-65. .
259. **Liu TX, Zhang JW, Tao J, Zhang RB, Zhang QH, Zhao CJ, Tong JH, Lanotte M, Waxman S, Chen SJ, Mao M, Hu GX, Zhu L, Chen Z.** Gene expression networks

- underlying retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. *Blood*. Aug, 2000, 96(4):1496-504.
260. **GJ., Roboz.** Current treatment of acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol*. Nov, 2012, 24(6):711-9. .
261. **RA., Shivdasani.** MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood*. Dec, 2006, 108(12):3646-53.
262. **Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB.** Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. Dec, 2003, 115(7):787-98.
263. **Garcia DM, Baek D, Shin C, Bell GW, Grimson A, Bartel DP.** Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of lsi-6 and other microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 11. September 2011, S. 1139-46.
264. **Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP.** Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*. Aug, 2015, 12;4. .
265. **Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP.** Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. January 2009, S. 19(1):92-105.
266. **Jin Y, Chen Z, Liu X, Zhou X.** Evaluating the microRNA targeting sites by luciferase reporter gene assay. *Methods Mol Biol*. 2013, 936:117-27.
267. **Zhuang LK, Xu GP, Pan XR, Lou YJ, Zou QP, Xia D, Yan WW, Zhang YT, Jia PM, Tong JH.** MicroRNA-181a-mediated downregulation of AC9 protein decreases intracellular cAMP level and inhibits ATRA-induced APL cell differentiation. *Cell Death Dis*. Apr, 2014, 5:e1161.
268. **Long ZJ, Hu Y, Li XD, He Y, Xiao RZ, Fang ZG, Wang DN, Liu JJ, Yan JS, Huang RW, Lin DJ, Liu Q.** ATO/ATRA/anthracycline-chemotherapy sequential consolidation achieves long-term efficacy in primary acute promyelocytic leukemia. *PLoS One*. Aug, 2014, 9(8):e104610.
269. **Pan XN, Chen JJ, Wang LX, Xiao RZ, Liu LL, Fang ZG, Liu Q, Long ZJ, Lin DJ.** Inhibition of c-Myc overcomes cytotoxic drug resistance in acute myeloid leukemia cells by promoting differentiation. *PLoS One*. Aug, 2014, 9(8):e105381. .
270. **Lv Y, Zeng L, Zhang G, Xu Y, Lu Y, Mitchelson K, Cheng J, Xing W.** Systematic dielectrophoretic analysis of the Ara-C-induced NB4 cell apoptosis combined with gene expression profiling. *Int J Nanomedicine*. 2013, 8:2333-50. .
271. **Banker DE, Groudine M, Norwood T, Appelbaum FR.** Measurement of spontaneous and therapeutic agent-induced apoptosis with BCL-2 protein expression in acute myeloid leukemia. *Blood*. Jan, 1997, 89(1):243-55.
272. **Gaillard C, Tokuyasu TA, Rosen G, Sotzen J, Vitaliano-Prunier A, Roy R, Passequé E, de Thé H, Figueroa ME, Kogan SC.** Transcription and methylation analyses

of preleukemic promyelocytes indicate a dual role for PML/RARA in leukemia initiation. *Haematologica*. Aug, 2015, 100(8):1064-75. .

273. **Müller-Tidow C, Steffen B, Cauvet T, Tickenbrock L, Ji P, Diederichs S, Sargin B, Köhler G, Stelljes M, Puccetti E, Ruthardt M, deVos S, Hiebert SW, Koeffler HP, Berdel WE, Serve H.** Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol*. Apr, 2004, 24(7):2890-904.

274. **Alcalay M, Meani N, Gelmetti V, Fantozzi A, Fagioli M, Orleth A, Riganelli D, Sebastiani C, Cappelli E, Casciari C, Scirupi MT, Mariano AR, Minardi SP, Luzi L, Muller H, Di Fiore PP, Frosina G, Pelicci PG.** Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair. *J Clin Invest*. Dec, 2003, 112(11):1751-61.

275. **Doucas V, Brockes JP, Yaniv M, de Thé H, Dejean A.** The PML-retinoic acid receptor alpha translocation converts the receptor from an inhibitor to a retinoic acid-dependent activator of transcription factor AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct, 1993, 90(20):9345-9.

276. **Tsuzuki S, Towatari M, Saito H, Enver T.** Potentiation of GATA-2 activity through interactions with the promyelocytic leukemia protein (PML) and the t(15;17)-generated PML-retinoic acid receptor alpha oncoprotein. *Mol Cell Biol*. Sep, 2000, 20(17):6276-86.

277. **Kawasaki A, Matsumura I, Kataoka Y, Takigawa E, Nakajima K, Kanakura Y.** Opposing effects of PML and PML/RAR alpha on STAT3 activity. *Blood*. May, 2003, 101(9):3668-73. .

278. **Pabst T, Mueller BU, Harakawa N, Schoch C, Haferlach T, Behre G, Hiddemann W, Zhang DE, Tenen DG.** AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat Med*. Apr, 2001, 7(4):444-51.

279. **Radomska HS, Huettner CS, Zhang P, Cheng T, Scadden DT, Tenen DG.** CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol Cell Biol*. 1998, 18(7):4301-4314.

280. **O'Hara SP, Splinter PL, Gajdos GB, Trussoni CE, Fernandez-Zapico ME, Chen XM, LaRusso NF.** NFkappaB p50-CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta)-mediated transcriptional repression of microRNA let-7i following microbial infection. *J Biol Chem*. Jan, 2010, 285(1):216-25.

281. **DP., Lane.** Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. Jul, 1992, 358(6381):15-6.

282. **Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK und Group., National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working.** Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal

abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. Jul, 2010, 116(3):354-65.

283. **Lujambio A, Lowe SW.** The microcosmos of cancer. *Nature*. Feb, 2012, 482(7385):347-55. .

284. **Gerloff D, Grundler R, Wurm AA, Bräuer-Hartmann D, Katzerke C, Hartmann JU, Madan V, Müller-Tidow C, Duyster J, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G.** NF- κ B/STAT5/miR-155 network targets PU.1 in FLT3-ITD-driven acute myeloid leukemia. *Leukemia*. Mar, 2015, 29(3):535-47.

285. **Xu L, Zhong H, Wan H, Chen FY, Zhong J, Xiao F, Liu J, Shen L.** miR-146a expression level as a novel putative prognostic marker for acute promyelocytic leukemia. *Dis Markers*. 2014, 2014:150604. .

286. **Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J, Soden R, Hayakawa M, Kreiman G, Cooke MP, Walker JR, Hogenesch JB.** A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr, 2004, 101(16):6062-7.

287. **Donninger H, Clark JA, Monaghan MK, Schmidt ML, Vos M, Clark GJ.** Cell cycle restriction is more important than apoptosis induction for RASSF1A protein tumor suppression. *J Biol Chem*. Nov, 2014, 289(45):31287-95. .

288. **Furukawa Y.** Cell cycle control during hematopoietic cell differentiation. *Hum Cell*. Sep, 1997, 10(3):159-64. Review.

289. **Wang J, Barsky LW, Shum CH, Jong A, Weinberg KI, Collins SJ, Triche TJ, Wu L.** Retinoid-induced G1 arrest and differentiation activation are associated with a switch to cyclin-dependent kinase-activating kinase hypophosphorylation of retinoic acid receptor alpha. *J Biol Chem*. Nov, 2002, 277(45):43369-76.

290. **Liu Y, Hock JM, Sullivan C, Fang G, Cox AJ, Davis KT, Davis BH, Li X.** Activation of the p38 MAPK/Akt/ERK1/2 signal pathways is required for the protein stabilization of CDC6 and cyclin D1 in low-dose arsenite-induced cell proliferation. *J Cell Biochem*. Dec, 2010, 111(6):1546-55.

291. **Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, Yokoyama A.** Over-expression of Mcl-1 impairs the ability of ATRA to induce growth arrest and differentiation in acute promyelocytic leukemia cells. *Apoptosis*. Nov, 2013, 18(11):1403-15.

292. **Davison K, Mann KK, Waxman S, Miller WH Jr.** JNK activation is a mediator of arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood*. May, 2004, 103(9):3496-502. .

293. **Brown D, Kogan S, Lagasse E, Weissman I, Alcalay M, Pelicci PG, Atwater S, Bishop JM.** A PML/RARalpha transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar, 1997, 94(6):2551-6.
294. **Insinga A, Monestiroli S, Ronzoni S, Carbone R, Pearson M, Pruneri G, Viale G, Appella E, Pelicci P, Minucci S.** Impairment of p53 acetylation, stability and function by an oncogenic transcription factor. *EMBO J*. Mar, 2004, 23(5):1144-54.
295. **Zhu J, Zhou J, Peres L, Riaucoux F, Honoré N, Kogan S, de Thé H.** A sumoylation site in PML/RARA is essential for leukemic transformation. *Cancer Cell*. Feb 2005, S. 7(2):143-53.
296. **Wethkamp N, Klempnauer KH.** Daxx is a transcriptional repressor of CCAAT/enhancer-binding protein beta. *J Biol Chem*. Oct, 2009, 284(42):28783-94. .
297. **Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, Brummelkamp TR, Fleming MD, Camargo FD.** Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*. Feb, 2008, 451(7182):1125-9.

7 Anhang

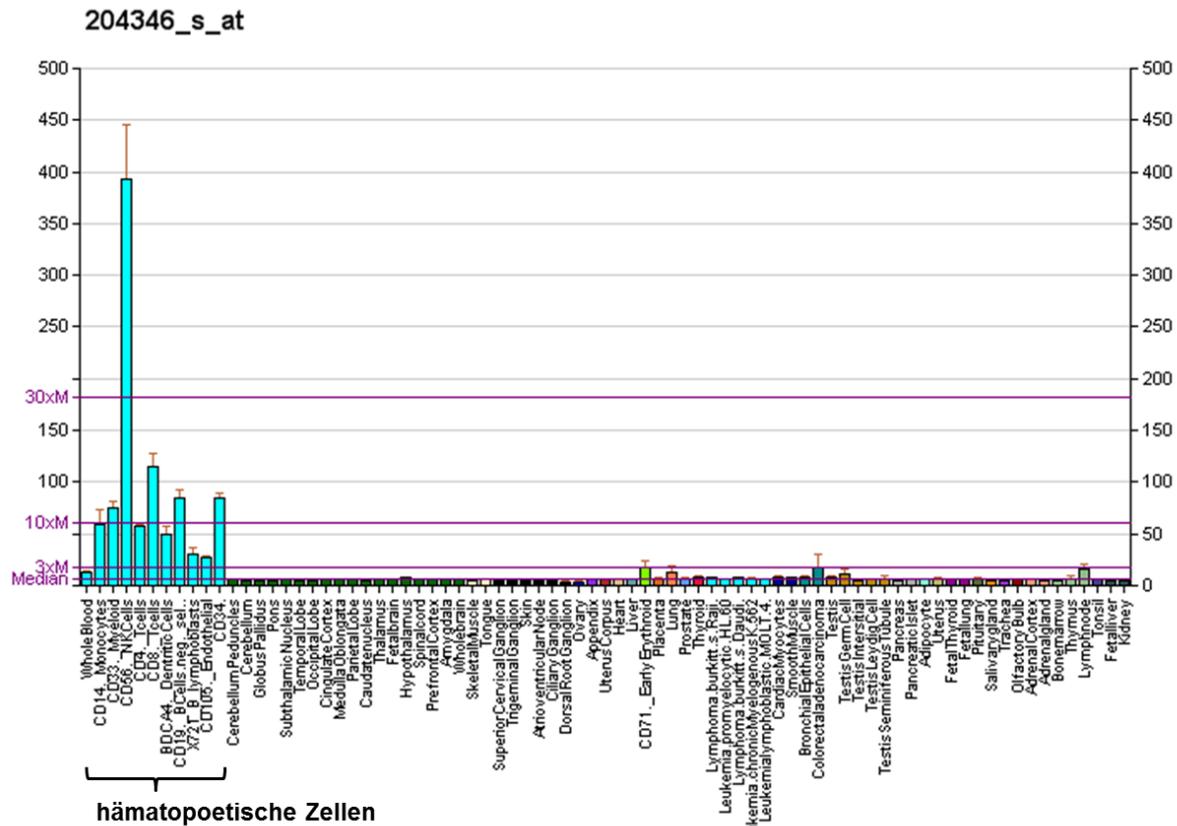


Abbildung A 1 Verstärkte Expression des *RASSF1*-Gens in Zellen des hämatopoetischen Systems.

Das Diagramm wurde erstellt durch AndrewGNF basierend auf Daten von Su et al. (286).

(URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/RASSF1>; Stand: 16.10.2015)

Selbstständigkeitserklärung

Diese Dissertation ist von der Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften der Martin- Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt worden.

Hiermit erkläre ich, Daniela Bräuer-Hartmann, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die aus fremden Quellen übernommenen Gedanken oder Graphiken 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.

Daniela Bräuer-Hartmann

Halle/ Saale, 01. 12. .2015

Erklärung über bisherige Promotionsversuche

Die vorliegende 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.

Daniela Bräuer-Hartmann

Halle/ Saale, 01. 12. 2015

Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die zum Gelingen dieses Vorhabens beigetragen haben.

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Gerhard Behre für die Überlassung des Themas, die langjährige finanzielle Unterstützung und die Möglichkeit zum eigenverantwortlichen Arbeiten bedanken.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. rer. nat. Sven Erik Behrens für die Betreuung meiner Dissertation am Bereich Biowissenschaften der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg.

Ich danke meinen Kollegen für das harmonische und freundschaftliche Arbeitsklima, die praktische wie fachliche Unterstützung sowie die intensiven und in vielerlei Hinsicht hilfreichen wissenschaftlichen Gedankenaustausche, aus denen so manche neue Idee geboren wurde.

Der größte Dank gilt in diesem Zusammenhang natürlich meinem Mann Jens-Uwe, hier als Kollegen. Ohne dich wären viele Experimente einfach nicht möglich gewesen. Danke für die Zeit, den Ehrgeiz und den Intellekt, den du in dieses Projekt investiert hast.

Bedanken möchte ich mich natürlich auch bei meinen Freunden.

Ihr haltet mir die Treue, trotz schwieriger Zeiten, bringt mich auf andere Gedanken und Freude in mein Leben.

Danke Gerit für die zahlreichen Gespräche, deine Unterstützung und nicht zuletzt für deine allen widrigen Umständen zum Trotz anhaltende Freundschaft.

Zuletzt gilt mein Dank meiner großen und kleinen Familie.

Ihr gebt mir jeden Tag die Kraft und den Mut nach vorn zuschauen und alle noch so großen und kleinen Aufgabe zu meistern.

Lebenslauf

Name	Daniela Bräuer-Hartmann, geb. Bräuer
Geburtsdatum	04.07.1979
Geburtsort	Marienberg/Erzgebirge
Familienstand	verheiratet, 2 Kinder
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Schulausbildung	
9/1986 - 5/1998	Abschluss mit Abitur
Studium	
10/1998 – 2/2005	Biologie (Diplom) an der Martin-Luther-Universität in Halle-Wittenberg; Abschluss als Diplom-Biologin
wissenschaftliche Tätigkeit nach Studienabschluss	
6/2005 – 10/2007	Arbeit an einem Kooperationsprojekt zwischen Prof. Dr. med. H. Behre (MLU, Medizin. Fakultät, Urologie, Sektion: Andrologie) und PD Dr. med. G. Behre (MLU, Medizin. Fakultät, Hämatologie/Onkologie) Thema: „Einfluss von Androgenen auf die microRNA-Expression humaner mesenchymaler Stammzellen“
11/2007 – 4/2011	wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
seit 5/2011	wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Promotion

seit 11/2007

Thema: „Charakterisierung des miR-181a/miR-181b-Clusters in der akuten Promyelozytenleukämie“

Auszeichnungen/ Stipendien

10/2010 – 04/2014

Forschungsstipendium der Deutschen José Carreras Stiftung e. V.

wissenschaftliche Kongressbeiträge

12/2008

Posterpräsentation auf dem jährlichen Treffen der *American Society of Hematology* (ASH)

10/2010

Posterpräsentation auf dem jährlichen Treffen der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO)

12/2011

Posterpräsentation auf dem jährlichen Treffen der *American Society of Hematology* (ASH)

10/2012

Posterpräsentation auf dem jährlichen Treffen der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO)

12/2014

Posterpräsentation auf dem jährlichen Treffen der *American Society of Hematology* (ASH)

Publikationen

- 12/2008 Vakhrusheva O, **Braeuer D**, Liu Z, Braun T, Bober E. Sirt7-dependent inhibition of cell growth and proliferation might be instrumental to mediate tissue integrity during aging. *J Physiol Pharmacol*. 2008 Dec;59 Suppl 9:201-12.
- 08/2013 Katzerke C, Madan V, Gerloff D, **Bräuer-Hartmann D**, Hartmann JU, Wurm AA, Müller-Tidow C, Schnittger S, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G. Transcription factor C/EBP α -induced microRNA-30c inactivates Notch1 during granulopoiesis and is downregulated in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013 Oct 3;122(14):2433-42. doi: 10.1182/blood-2012-12-472183. Epub 2013 Aug 23.
- 03/2015 Gerloff D, Grundler R, Wurm AA, **Bräuer-Hartmann D**, Katzerke C, Hartmann JU, Madan V, Müller-Tidow C, Duyster J, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G. Nf κ B/STAT5/miR-155 network targets PU.1 in FIT3-IDT driven acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015 Mar;29(3):535-47. doi: 10.1038/leu.2014.231. Epub 2014 Aug 5.
- 07/2015 Kraus M, Greither T, Wenzel C, **Bräuer-Hartmann D**, Wabitsch M, Behre HM. Inhibition of adipogenic differentiation of human SGBS preadipocytes by androgen-regulated microRNA miR-375. *Mol Cell Endocrinol*. 2015 Oct 15;414:177-85. doi: 10.1016/j.mce.2015.07.026. Epub 2015 Jul 26.
- 08/2015 **Bräuer-Hartmann D**, Hartmann JU, Wurm AA, Gerloff D, Katzerke C, Verga Falzacappa MV, Pelicci PG, Müller-Tidow C, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G. PML/RAR α -regulated miR-181a/b cluster targets the tumor suppressor RASSF1A in Acute Promyelocytic Leukemia. *Cancer Res*. 2015 Aug 15;75(16):3411-24. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3521. Epub 2015 Jun 3.