

**Regulatorische und funktionelle Untersuchungen
der miR-155 in der FLT3-ITD assoziierten akuten
myeloischen Leukämie**

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herr Dennis Gerloff

geb. am 15.01.1981 in Magdeburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Elmar Wahle
2. Prof. Dr. Gerhard Behre
3. Prof. Dr. Carsten Müller-Tidow

öffentliche Verteidigung am 17.12.2015

„It doesn't matter how beautiful your theory is, it doesn't matter how smart you are. If it doesn't agree with experiment, it's wrong.”

Richard P. Feynman

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Hämatopoese	1
1.2	Leukämie	3
1.2.1	Die akut myeloische Leukämie	4
1.3	Der FLT3 Rezeptor	6
1.3.1	Der FLT3-Rezeptor in der normalen Hämatopoese	7
1.3.2	Der FLT3 Rezeptor in der AML.....	8
1.4	MicroRNAs.....	9
1.4.1	microRNAs: Biogenese und Funktion	10
1.4.2	miRNAs in der Hämatopoese und Leukämogenese	11
1.4.3	Die miR-155.....	12
2.	Material und Methoden	14
2.1	Materialien	14
2.1.1	Geräte und Software.....	14
2.1.2	Reagenzien.....	15
2.1.3	Biologische Materialien	22
2.2	Methoden.....	25
2.2.1	Zellkultur	25
2.2.2	Klonale Koloniewachstumsanalysen.....	26
2.2.3	Gesamt-RNA-Extraktion	26
2.2.4	Konzentrationsbestimmung der RNA.....	26
2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	27
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	29
2.2.7	microRNA-Array.....	29
2.2.8	Klonierung.....	30
2.2.9	<i>In-vitro</i> -Mutagenese	31
2.2.10	Gewinnung von Plasmiden	31
2.2.11	Transiente Transfektion	32
2.2.12	Pappenheim-Färbung (May- Grünwald- Giemsa)	32
2.2.13	Gewinnung des miRZip-155 Lentivirus	33

2.2.14	Transduktion der Zellen mit dem Lentivirus	33
2.2.15	Luziferase-Reporter-Assay	33
2.2.16	Durchflusszytometrie (FACS).....	34
2.2.17	Bestimmung der Proteinkonzentration	34
2.2.18	Elektrophoretische Auftrennung der Proteine in einem SDS- Polyacrylamidgel.....	34
2.2.19	Western-Blot	35
2.2.20	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	36
2.2.21	Statistische Auswertung.....	36
3.	Ergebnisse.....	37
3.1	MicroRNA Expressionsanalyse während der MCSF induzierten Differenzierung von CD34⁺/CD38⁺ Progenitorzellen.....	37
3.1.1	Etablierung eines MCSF induzierten Differenzierungsmodells von CD34 ⁺ /CD38 ⁺ Progenitorzellen	37
3.1.2	MicroRNA Expressionsanalysen in der myeloiden Differenzierung von humanen CD34 ⁺ /CD38 ⁺ Progenitorzellen	42
3.2	Funktionelle und Regulatorische Analyse der miR-155 in der FLT3-ITD assoziierten AML	46
3.2.1	miR-155 Expression in AML Patienten	46
3.2.2	Die Überexpression von FLT3-ITD induziert die miR-155 Expression	48
3.2.3	Der Block der FLT3-ITD Tyrosinkinaseaktivität reduziert die miR-155 Expression	50
3.2.4	Der Block von STAT5 führt zur Reduktion der miR-155 Expression	51
3.2.5	Der Block von NF-κB (p65) führt zur Reduktion der miR-155 Expression	54
3.2.6	NF-κB (p65) bindet direkt am miR-155 Promotor.....	57
3.2.7	Konstitutiv aktives STAT5 verstärkt die NF-κB (p65) induzierte miR- 155 Promotoraktivität	59
3.2.8	Die Reduktion der miR-155 Expression ist wichtig für die myeloide Differenzierung.....	61
3.2.9	PU.1 ist eine direktes Ziel der miR-155.....	64
3.2.10	Die miR-155 ist wichtig für die FLT3-ITD induzierte maligne Transformation.....	66

3.2.11	Die Überexpression des miR-155 Ziels PU.1 in FLT3-ITD assoziierten AML-Zellen induziert Apoptose.....	70
3.3	Block der miR-155 als therapeutischer Ansatz in der FLT3-ITD assoziierten AML	71
3.3.1	Etablierung eines FLT3-ITD Mausmodells.....	71
3.3.2	LNA-vermittelter Block der miR-155 im FLT3-ITD assoziierten AML Mausmodell.....	74
3.3.3	Lentiviraler <i>Knockdown</i> der miR-155 im FLT3-ITD assoziierten AML Mausmodell.....	78
4.	Diskussion	82
4.1	Regulatorische Analysen der miR-155 in der FLT3-ITD assoziierten AML	82
4.2	Funktionelle Analysen der miR-155 in der FLT3-ITD assoziierten AML	86
4.3	Block der miR-155 als therapeutischer Ansatz in der FLT3-ITD assoziierten AML	89
5.	Zusammenfassung.....	93
6.	Referenzen.....	94
7.	Anhang.....	107

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
3'UTR	3' Untranslatierte Region
AKT	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AP1	Aktivatorprotein 1
APL	akute promyelozytäre Leukämie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATRA	<i>all trans retinoic acid</i> ; All-Trans Retinolsäure
BACH1	<i>BTB and CNC homology 1</i>
BIC	<i>B-cell Integration Cluster</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> ; Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C	Celsius
C/EBPα	<i>CAAT enhancer binding protein α</i>
ca.	Circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CLP	<i>common lymphoid progenitor</i> ; lymphoide Vorläuferzellen
cm	Zentimeter
CML	chronische myeloische Leukämie
CMP	<i>common myeloid progenitor</i> ; myeloiden Vorläuferzellen
D	Aspartat
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylcarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

DTT	Dithiothreitol
E2A	TCF3; Transkriptionsfaktor 3
E2F1	E2F Transkriptionsfaktor 1
E2F2	E2F Transkriptionsfaktor 2
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i> ; Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extrazellulär-Signal Regulierte Kinase
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i> ; fötales Rinderserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	FLT3 Ligand
FLT3	<i>FMS-like tyrosin kinase 3</i>
FOXO3a	<i>Forkhead box protein O3</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA1	<i>GATA binding protein 1</i>
GATA3	<i>GATA binding protein 3</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GMP	<i>granulocyte macrophage progenitor</i> ; Granulozyten Makrophagen Vorläuferzellen
H ₂ O	Wasser
HCL	Salzsäure
HMW	<i>high molecular weight</i>
HSC	hämatopoetische Stammzellen
hu	Human
IL-3	Interleukin 3
IL-6	Interleukin 6
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Media</i>
inv.16	Inversion 16
ITD	interne Tandemduplikation
kb	Kilobasen
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
LSK	Lin ⁻ Sca1 ⁺ Kit ⁻ Zellpopulation
m	Männlich
M	Molar
mA	Milliampere
MCSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>

MEK	Kinase der MAP-Kinase
MEP	<i>megakaryocyte erythroid progenitor</i> ; Megakaryozyten Erythrozyten Vorläufer
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MPP	<i>multipotent progenitor</i> ; Multipotente Vorläufer
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MUT	Mutante
n	Anzahl
NFI-A	<i>Nuclear factor 1 A-type</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NPM1	<i>Nucleophosmin</i>
P/S	Penicillin / Streptomycin
Pax5	<i>Paired box 5</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphatpuffer
PBST	<i>phosphate buffered saline with Tween 20</i> ; Phosphatpuffer mit Tween 20
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pipC	<i>polyinosinic:polycytidylic acid</i>
PKI	Proteinkinaseinhibitor
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
pmol	Pikomol
PU.1	<i>Spi-1 proto-oncogene</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>

RNA	<i>Ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RNA Pol II	<i>RNA Polymerase II</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s	Sekunde
SCF	Stammzellfaktor
scr	<i>Scramble</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SHIP1	<i>Inositol polyphosphate-5-phosphatase</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
Stabw.	Standardabweichung
STAT5	<i>Signal transducer and activator of transcription 5</i>
STAT5i	<i>Signal transducer and activator of transcription 5 inhibitor</i>
t(15;17)	Translokation (15;17)
t(8;21)	Translokation (8;21)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TKD	Tyrosinkinasedomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt
w	Weiblich
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

1.1 Hämatopoese

Die Hämatopoese beschreibt den Prozess der Differenzierung von naiven multipotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSC) zu reifen funktionellen Blutzellen. Bei der Hämatopoese unterscheidet man zwischen der embryonalen und der adulten Hämatopoese. Die embryonale Hämatopoese findet in den ersten Wochen der Säugetier-Embryogenese statt. Hierbei werden erstmals Blutzellen im embryonalen Dottersack gebildet. Während der weiteren embryonalen Entwicklung verlagert sich die Hämatopoese in die Leberanlagen des Embryos und erst kurz vor der Geburt ist der Hauptteil der Hämatopoese im Knochenmark lokalisiert [1]. Die adulte Hämatopoese (Abbildung 1) findet im Knochenmark und in den lymphatischen Organen statt. HSCs zeichnen sich durch ihr unendliches Selbsterneuerungs- und ihr multipotentes Differenzierungspotential aus. Mit zunehmenden Differenzierungsstatus verlieren die hämatopoetischen Zellen ihre Stammzeleigenschaften. Die Multipotenten Progenitorzellen (MPP) besitzen noch das hohe Differenzierungspotential der HSCs, zeigen jedoch nur noch begrenzte Selbsterneuerungseigenschaften [2]. Durch die weitere Reifung können sich aus den MPPs die myeloiden Vorläuferzellen (CMPs) oder die lymphatischen Vorläuferzellen (CLPs) entwickeln [3-4]. Die CLPs entwickeln sich über linienspezifische Vorläuferzellen zu reifen B- und T-Lymphozyten sowie zu natürlichen Killerzellen. Aus den CMPs bilden sich einerseits die Megakaryozyten- und Erythrozyten-Vorläuferzellen (MEPs), welche dann zu Megakaryozyten bzw. Thrombozyten und Erythrozyten ausreifen und andererseits die granulozytären und monozytären Vorläuferzellen (GMPs), aus denen sich die Granulozyten und Monozyten entwickeln [1, 5]. Die während der Hämatopoese entstehenden Zellsubpopulationen können anhand von verschiedenen Zelloberflächenmarkern (CD (*cluster of differentiation*)) identifiziert werden. Die hämatopoetische Stammzelle zeichnet sich durch die Expression des Zelloberflächenmarkers CD34 aus [6-7]. Während der myeloiden Differenzierung wird auf den GMPs der Oberflächenmarker CD11b exprimiert [8]. Die reifen Granulozyten exprimieren zusätzlich den CD15 Oberflächenmarker, während die Monozyten und

Makrophagen anhand des CD14 Oberflächenmarkers identifiziert werden können [8].

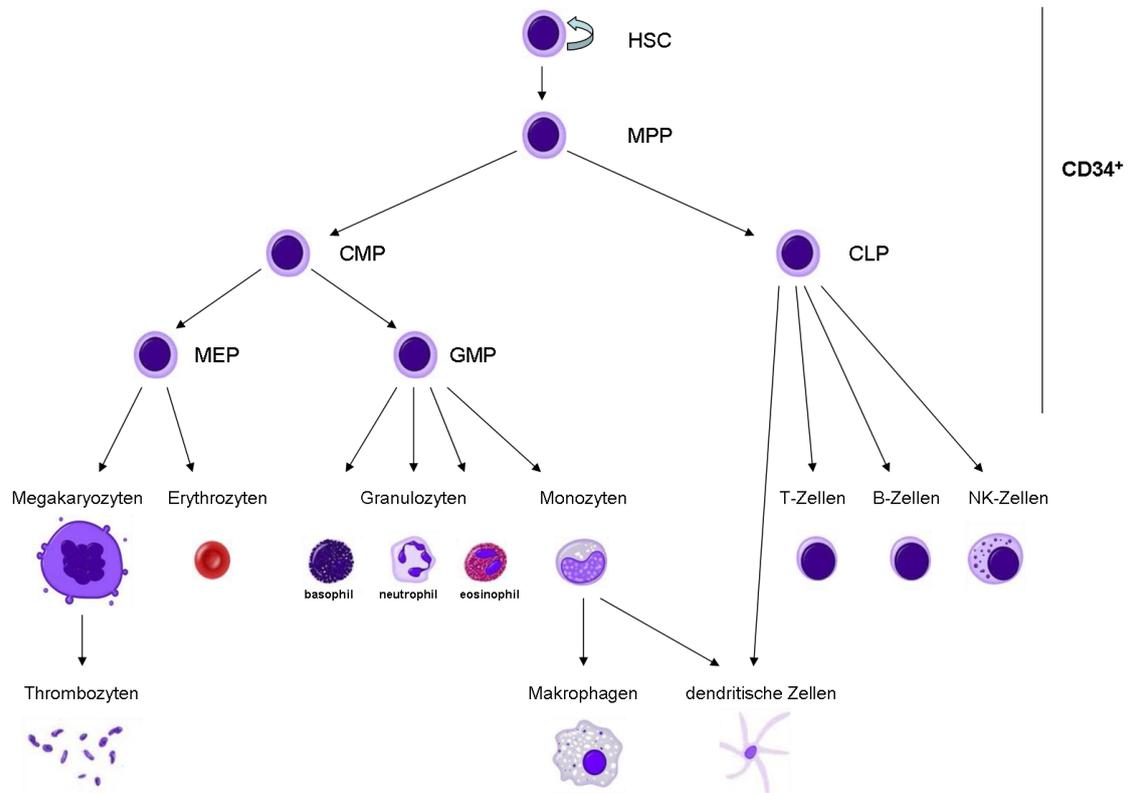


Abbildung 1: Schematische Übersicht der Hämatopoese (verändert nach Rieger et al., de Bruin et al. und Egeland et al. [1, 5, 8]).

Die Prozesse der hämatopoetischen Differenzierung werden durch verschiedene Transkriptionsfaktoren gesteuert. Die Differenzierung der lymphoiden Linien wird maßgeblich durch die Transkriptionsfaktoren GATA-3, Pax5 und E2A gesteuert [9-10]. An der Entwicklung der Megakaryozyten und Erythrozyten sind GATA-1 und GATA-2 entscheidend beteiligt [10-11]. Die Differenzierung der myeloiden Linien wird hauptsächlich durch die beiden Transkriptionsfaktoren PU.1 und C/EBP α kontrolliert [10, 12]. Während C/EBP α der Hauptregulator für die Differenzierung von Granulozyten ist [12-13], wird die monozytäre Differenzierung durch PU.1 reguliert [10, 12-13]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass PU.1 schon in den frühen Stadien der Hämatopoese, sowie bei der B-Zell Differenzierung eine wichtige Rolle spielt [14-16]. Der Block von PU.1 führt zum Verlust von reifen Monozyten, neutrophilen Granulozyten, B- und T-Zellen [14-16]. Die Reduktion der PU.1 Expression induziert eine akute myeloische Leukämie (AML) [17-18].

1.2 Leukämie

Leukämien sind eine heterogene Gruppe maligner Erkrankungen des blutbildenden bzw. des lymphatischen Systems. Allen Leukämien liegt eine Entartung von frühen Vorläuferzellen der normalen Blutbildung zugrunde. Die leukämischen Zellen verlieren dabei die Fähigkeit zur Ausreifung zu funktionsfähigen Blutzellen und entziehen sich somit den normalen Kontrollmechanismen von Zellwachstum und Differenzierung. Dies führt zum Mangel von funktionsfähigen Blut- und Immunzellen. Die folgende generalisierte Ausbreitung im blutbildenden Knochenmark und im lymphatischen System führt zur Verdrängung der regulären Hämatopoese und letztlich zu einer Ausschwemmung leukämischer Zellen ins periphere Blut. Man unterscheidet nach den betroffenen Zelltypen zwischen den myeloischen und den lymphatischen Leukämien. Zusätzlich wird zwischen akuten Leukämien, bei denen die Blutvorläuferzellen nicht ausdifferenzieren, und chronischen Leukämien, bei denen die Zellen zwar ausdifferenzieren aber hyperproliferativ sind, unterschieden. So lassen sich Leukämien klinisch und immunologisch/zytologisch in vier Hauptformen unterteilen:

1. akut myeloische Leukämie (AML)
2. akut lymphatische Leukämie (ALL)
3. chronisch myeloische Leukämie (CML)
4. chronisch lymphatische Leukämie (CLL)

Etwa 11500 Menschen sind 2010 in Deutschland an einer Leukämie erkrankt [19]. Das Erkrankungsrisiko für Leukämien sinkt bei Kindern mit zunehmendem Alter und nimmt etwa ab dem 30. Lebensjahr wieder kontinuierlich zu. Die absolute 5 Jahres Überlebensrate von Leukämiepatienten betrug 2009 -2010 im Median 47 % [19].

1.2.1 Die akut myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine klonale Erkrankung der Myelopoese mit Transformation einer frühen myeloischen Vorläuferzelle. Es kommt zu einer z.T. massiven Vermehrung unreifer Vorläuferzellen im Knochenmark mit einer Verdrängung der normalen Hämatopoese und einer Ausschwemmung der Zellen in das periphere Blut (Leukozytose). Die Verdrängung der Hämatopoese mit Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie führt zu den meist eher unspezifischen Symptomen der Erkrankung. So klagen die Patienten häufig über Abgeschlagenheit, Müdigkeit, Tachykardie, Blässe sowie häufige Infekte. Zusätzlich besteht eine gesteigerte Blutungsneigung. Bei ca. 10 % der Fälle kann eine aleukämische Präsentation mit Leukopenie beobachtet werden. Die AML tritt mit einer Inzidenz von 3-4 Fällen pro 100000 Einwohner pro Jahr mit einer steigenden Häufigkeit im höheren Lebensalter auf [20]. Sie macht insgesamt 3 % aller malignen Erkrankungen aus und ist die häufigste tödlich verlaufende Neoplasie zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr [20]. Als Risikofaktoren für die Entwicklung einer AML gelten die Knochenmarkschädigung durch Noxen (ionisierende Strahlen, alkylierende Substanzen, Topoisomerasehemmer, Benzol, Zigarettenrauch), prädisponierende hämatologische Erkrankungen wie das myelodysplastische Syndrom, aplastische Anämie, Multiples Myelom (in dem Fall spricht man von der Entwicklung einer sekundären AML) und genetische Faktoren (Trisomie 21, Fanconi-Anämie, Bloom-Syndrom). Oft liegen einer AML chromosomale Aberrationen zugrunde, so z. B. Translokationen (t(8;21), t(15;17), inv(16)) oder Deletionen (gesamter Arm oder ein Teil von Chromosom 5q, 7q, 20q oder 12p; Trisomien +8, +13, +21).

Die unterschiedlichen Subgruppen innerhalb der AML unterscheiden sich anhand der Differenzierungsstadien der myeloischen Progenitorzellen (Klassifizierung der AML M0 bis M7 nach der French-American-British Cooperative Group; FAB-Klassifikation) (Tabelle 1).

Tabelle 1: FAB-Klassifikation der AML [21-23]

AML- Subtypen		Häufigkeit (in % von AML)
M0	Minimal differenzierte AML	5
M1	AML ohne Ausreifung	10
M2	AML mit Ausreifung	30 - 45
M3	Akute Promyelozyten- Leukämie APL	5 - 8
M3V	Variante Microgranuläre APL	
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	15 -25
M4Eo	mit Eosinophilie	
M5	Akute monozytäre Leukämie a) undifferenziert b) differenziert	3 - 6
M6	Akute Erythroleukämie	5 - 6
M7	Akute megakaryozytäre Leukämie	3 - 5

Gegenwärtig erfolgt die klinische Einteilung der AML nach der WHO-Klassifikation, die 1999 etabliert wurde. Sie berücksichtigt die morphologischen und immunphänotypischen Kriterien der FAB-Klassifikation, bezieht jedoch auch genetische, biologische und klinische Merkmale mit ein [22, 24].

1. AML mit spezifischen genetischen Abnormalitäten
2. AML mit multilinearer Dysplasie
3. AML, sonst nicht kategorisiert
4. AML mit undefiniertem Phänotyp

Die AML wurde in ihren frühen Beschreibungen als „akute“ Erkrankung definiert, da es zum damaligen Zeitpunkt noch keine Möglichkeiten gab, den rasch progredienten Krankheitsverlauf aufzuhalten. Heute besteht die Behandlung der AML mit kurativer Intention in einer systemischen Chemotherapie. Darunter erreichen in Abhängigkeit von Risikoprofil und Alter 60–70 % der Patienten eine komplette Remission nach dem ersten Behandlungszyklus. Die mediane Remissionsdauer beträgt jedoch nur 12 bis 14 Monate, danach schließen sich weitere Zyklen Chemotherapie oder eine allogene Stammzelltransplantation als Therapiemöglichkeiten an. Eine Ausnahme bietet die APL (akute Promyelozytenleukämie, nach FAB AML Typ M3). Bei dieser Subform der AML, kann allein durch die Behandlung mit ATRA (all-trans-Retinolsäure) und Chemotherapie eine Langzeitüberlebensrate von über 90 % erzielt werden [25].

Da die Therapie der AML bei einer hohen Remissionsrate viele schwerwiegende Nebenwirkungen und Komplikationen hat, sollte es weiterhin Bestrebungen geben, besser verträgliche Therapien zu entwickeln, die den Patienten eine lang anhaltende Remission ohne die bekannten Therapiekomplicationen ermöglichen.

1.3 Der FLT3 Rezeptor

Der FMS-*like* Tyrosin Kinase 3 Rezeptor (FLT3) spielt eine wichtige Rolle in der normalen Hämatopoese und bei der Ausbildung von Leukämien. *Flt3* ist auf dem Chromosom 13q12 lokalisiert und gehört zur Type III Rezeptor Tyrosin Kinase (RTK) Familie. Alle Mitglieder der RTK III Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Proliferation, Differenzierung und dem Überleben normaler hämatopoetischer Zellen [26]. Der membrangebundene FLT3 Rezeptor besteht aus einer extrazellulären Region mit fünf immunglobulinähnlichen Domänen, der Transmembrandomäne, der Juxtamembrandomäne und zwei Tyrosinkinasedomänen (Abbildung 2) [27]. Der FLT3 Rezeptor wird hauptsächlich in hämatopoetischen Progenitorzellen im Knochenmark, Thymus oder den Lymphknoten exprimiert [28].

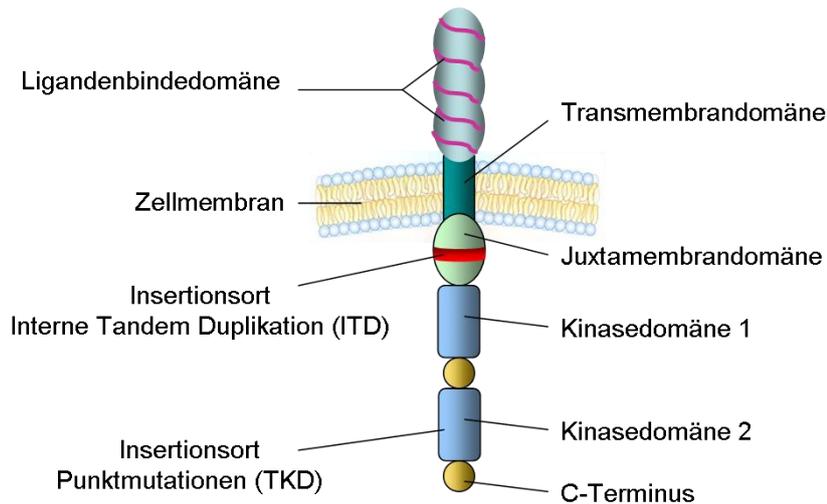


Abbildung 2: Schematische Übersicht des FLT3 Rezeptors (nach Litzow [29]).

1.3.1 Der FLT3-Rezeptor in der normalen Hämatopoese

Die funktionelle Regulation des FLT3 Rezeptors während der hämatopoetischen Differenzierung stellt einen wichtigen Prozess dar. Die Aktivierung des FLT3 Rezeptors erfolgt durch die Bindung des FLT3 Liganden (FL) an der extrazellulären Ligandenbindedomäne. Der FL ist ein Transmembranprotein und wird von Knochenmark Fibroblasten [30], hämatopoetischen Zellen der myeloiden Linien sowie B- und T-Zelllinien exprimiert [31]. Der FL kann als membrangebundenes sowie als ungebundenes Protein vorkommen [32-33]. Die Bindung zwischen FLT3 und FL führt zur Homodimerisierung des Rezeptors, gefolgt von Autophosphorylierung und Phosphorylierung von cytoplasmatischen Substraten. Die Aktivierung des FLT3 Rezeptors führt zur Induktion der PI3K-AKT [34-35], Ras-Raf-MEK-ERK [36-37] sowie STAT5 Signalwege [38], die in die Regulation von Proliferation und Differenzierung unreifer hämatopoetischer Zellen involviert sind (Abbildung 3) [39].

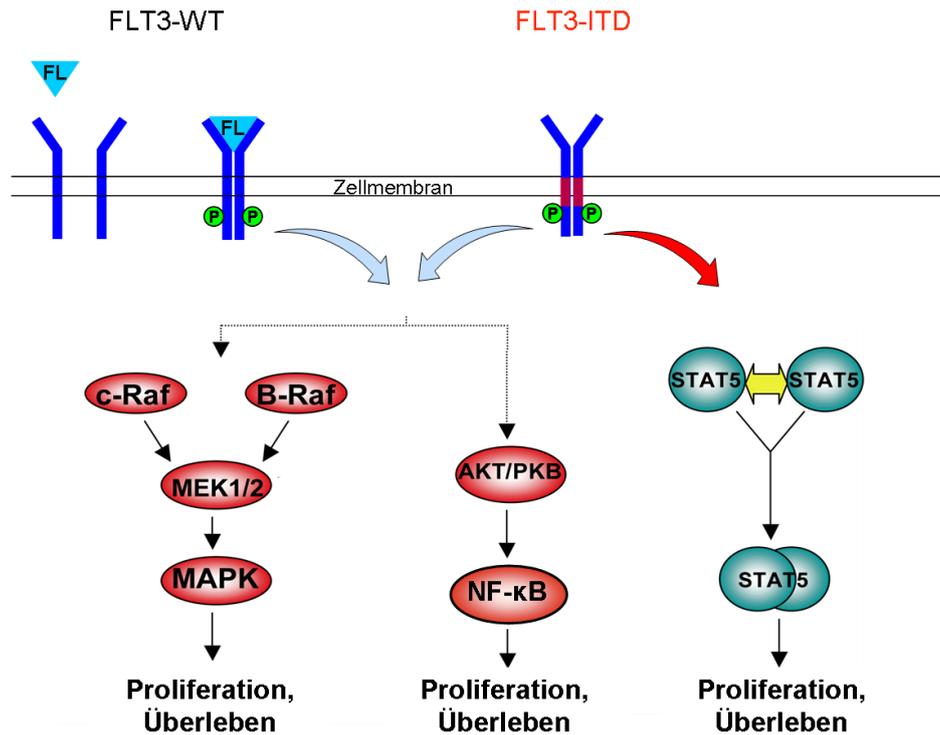


Abbildung 3: Übersicht der FLT3 aktivierten Signalwege. Durch die FLT3-ITD Mutation werden die Ras-Raf-MEK-ERK, PI3K-AKT Signalwege sowie die STAT5 Aktivierung konstitutiv induziert (nach Takahashi et al. [40]).

1.3.2 Der FLT3 Rezeptor in der AML

Mehrere Studien haben gezeigt, dass der FLT3 Rezeptor in ca. 93 % der AMLs anomal und erhöht exprimiert wird [41-44]. Zusätzlich sind 30 % aller AMLs mit einer Tyrosinkinase aktivierenden Mutation des FLT3 Rezeptors assoziiert [45]. Hierbei werden hauptsächlich zwei Mutationen unterschieden: (1) die interne Tandemduplikation (ITD) [46] und (2) die Punktmutationen in der zweiten Tyrosinkinasedomäne (TKD) [47-48]. Bei den internen Tandemduplikationen handelt es sich um Insertionen von zusätzlichen Nukleotiden von variabler Länge (3-400 bp) und Lokalisierung in der Juxtamembrandomäne des FLT3 Rezeptors [49]. Bei den FLT3-TKD Mutationen tritt meist eine Nukleotidsubstitution im Codon 835 auf, die einen Aminosäureaustausch von Aspartat zu Tyrosin (D835Y) verursacht [49]. Die FLT3-ITD tritt bei ca. 15-35 % aller AML Patienten auf, während die FLT3-TKD bei ca. 5-10 % aller AMLs gefunden werden kann [49]. Beide Mutationen führen zur konstitutiven und FL unabhängigen Aktivierung der

FLT3 Tyrosinkinaseaktivität und induzieren die FLT3 Signalwege PI3K-AKT, Ras-Raf-MEK-ERK [50-54]. Während die FLT3-ITD zusätzlich zu einer starken Aktivierung von STAT5 führt, konnte für die FLT3-TKD Mutation und den FL aktivierten FLT3 Wildtyp keine bzw. lediglich eine geringe STAT5 Aktivierung gezeigt werden [50-57] (Abbildung 3). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die FLT3-ITD induzierten Signalwege bzw. eine erhöhte FLT3 Expression zur Aktivierung von NF- κ B führen [58-60]. Die durch FLT3-ITD deregulierten Signalwege induzieren erhöhte Proliferation, Überleben und den Block der Differenzierung von leukämischen Zellen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die FLT3-ITD zur Suppression der myeloiden Transkriptionsfaktoren C/EBP α [61-62] und PU.1 [50, 62] führt, was für die FLT3-TKD nicht zutrifft. Für C/EBP α konnte gezeigt werden, dass Hyperphosphorylierung am Serin 21 durch FLT3-ITD aktiviertes ERK1/2 zu einem Block der C/EBP α Funktion führt [61]. Für die Suppression von PU.1 konnte bis jetzt noch kein funktioneller Mechanismus nachgewiesen werden. In klinischen Untersuchungen konnte für FLT3-TKD Mutationen kein prognostischer Einfluss auf den Verlauf einer AML gezeigt werden, im Gegensatz dazu sind FLT3-ITDs mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert [63-65]. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass der Block der FLT3 Tyrosinkinaseaktivität [66-70] oder der FLT3-ITD induzierten Signalwege wie STAT5 [71] und NF- κ B [72-73] eine reduzierte Proliferation bzw. erhöhte Mortalität oder gar die Differenzierungsfähigkeit [74] von FLT3-ITD assoziierten leukämischen Zellen bewirkt. Daher sollten weitere Ziele der FLT3-ITD induzierten Signalkaskade als neue therapeutische Ansätze in der FLT3-ITD assoziierten AML untersucht werden.

1.4 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, 19 – 25 Nukleotide lange, nicht kodierende RNAs, die die Genexpression durch Translationsinhibierung regulieren. Dazu binden die miRNAs an homologe Bereiche ihrer Ziel-mRNA und leiten deren Degradierung bzw. eine Translationsinhibierung ein [75-76]. Die erste beschriebene microRNA, war die lin-4 [77]. Sie wurde vor über 20 Jahren in *C. elegans* entdeckt. Viele miRNAs sind auch in entfernter verwandten Organismen

hoch konserviert, was den Schluss zulässt, dass miRNAs in essentielle Prozesse eingebunden sind. So wurde gezeigt, dass microRNAs die Genexpression unter anderem während der embryonalen Entwicklung [78], Zellproliferation [79], Apoptose [79], des Glukosemetabolismus [80], und bei der Krebsentstehung [81-83] regulieren. Bis heute konnten schon über 2500 miRNAs beim Menschen identifiziert werden (<http://mirbase.org>).

1.4.1 microRNAs: Biogenese und Funktion

Die MicroRNA-Gene sind in allen Spezies relativ gleichmäßig auf den verschiedenen Chromosomen verteilt, mit Ausnahme des Y-Chromosoms, auf dem nur sehr wenige bis keine miRNAs gefunden werden konnten [84]. Circa 50 % der bekannten miRNAs treten als Gencluster auf [85-86]. Die Primärtranskripte der miRNAs sind polycystronische Einheiten [87]. Analysen haben gezeigt, dass viele miRNA-Gene in Transkriptionseinheiten (TE) lokalisiert sind [88]. So konnten Rodriguez et al. zeigen, dass miRNAs sowohl in Introns als auch in Exons auftreten können [88]. Demnach können miRNAs in vier Gruppen unterteilt werden: Intron lokalisierte miRNAs, Exon lokalisierte miRNAs, miRNAs die zwischen zwei Genen liegen (intergenisch) und anders lokalisierte miRNAs [84]. Viele miRNAs liegen in Introns von Protein kodierenden Genen. Hier konnte gezeigt werden, dass diese miRNAs über dieselben Promotoren wie ihr „Wirtsgen“ reguliert werden [85, 88-89]. In verschiedenen Studien wurden auch microRNA spezifische Promotoren nachgewiesen [85, 90-92]. MicroRNA-Gene werden von der RNA Pol II transkribiert [93] und anschließend prozessiert (Abbildung 4). Das erste Transkript welches länger als 1 kb sein kann, wird als primäre miRNA (pri-miRNA) bezeichnet. Die pri-miRNA wird durch den Drosha-Komplex zu einem 60-80 bp langen Haarnadelkomplex, der Vorläufer-miRNA (pre-miRNA), gekürzt [87]. Diese pre-miRNA wird dann durch Exportin-5 aus dem Zellkern transportiert und im Cytoplasma vom Dicer-Komplex in einen ca. 22 Nukleotide langen miRNA Doppelstrang prozessiert [87]. Die reife miRNA wird in den RNA induzierten Silencingkomplex (RISC) geladen [94]. Der miRNA-RISC Komplex bindet anschließend an komplementäre Regionen in der 3' untranslatierten Region (3'UTR) von mRNAs [95]. Durch die Bindung des miRNA-RISC Komplex an der

3'UTR einer mRNA kommt es zur translationellen Repression [95]. Da die Komplementarität zwischen miRNA und mRNA nur auf wenige Nukleotide beschränkt ist, kann eine miRNA sehr viele putative mRNA-Ziele haben. Andererseits bedeutet dies, dass mehrere miRNAs an der translationellen Regulation einer mRNA beteiligt sein können [96].

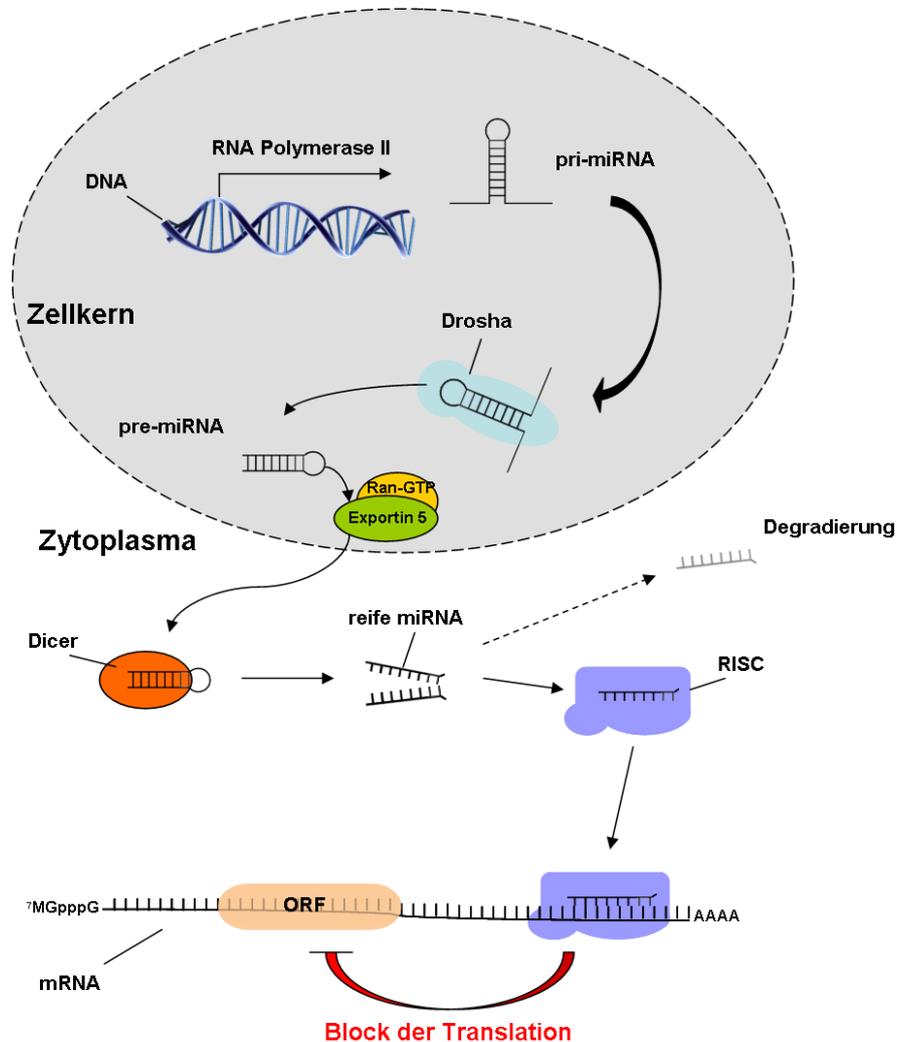


Abbildung 4: Schematische Darstellung der miRNA Prozessierung (nach Slack und Weidhaas [97]).

1.4.2 miRNAs in der Hämatopoese und Leukämogenese

MicroRNAs spielen eine wichtige Rolle in vielen biologischen Prozessen. Auch bei der Hämatopoese und bei der Leukämie Entstehung wurden viele miRNAs funktionell untersucht. Eine der wohl bekanntesten miRNAs während der

myeloiden Differenzierung ist die miR-223. Die miR-223 ist wichtig für die Ausbildung von Granulozyten [98]. Weiterhin wurde gezeigt, dass die miR-223 durch den myeloiden Transkriptionsfaktor C/EBP α reguliert wird [91, 98]. Als Ziele der miR-223 wurden NFI-A [98] und der Zellzyklusregulator E2F1 publiziert [91]. Für die miR-29 wurde ebenfalls eine Funktion während der myeloiden Differenzierung beschrieben. So induziert die Expression der miR-29 die monozytäre und granulozytäre Differenzierung von CD34⁺ HSCs [99]. Als Beispiel für eine lymphoide differenzierungsassoziierte miRNA ist die miR-181 zu nennen [100]. Im Gegensatz dazu wurde für die miR-181 auch gezeigt, dass sie bei erhöhter Expression einen myeloiden Differenzierungsblock bei der AML auslöst [101]. So kann am Beispiel der miR-181 gezeigt werden, dass miRNAs, wenn sie zum richtigen Zeitpunkt im entsprechenden Maß exprimiert werden, als Feinregulatoren der Differenzierung fungieren. Die Dysregulation der miRNA Expression kann jedoch zur Störung der Differenzierung bzw. zur Leukämieentstehung führen. Eine weitere, sehr prominente und viel untersuchte miRNA die bei der Hämatopoese involviert ist, ist die miR-155, die im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht.

1.4.3 Die miR-155

Die miR-155 wurde erstmals 2002 in einem globalen gewebsspezifischen miRNA-Screen in der Maus identifiziert [102]. Im humanen Genom, ist die miR-155 im dritten Exon des nichtkodierenden Gen *Bic* auf Chromosomen 21 lokalisiert [103]. 2005 wurde die miR-155 erstmals funktionell beschrieben [103-104]. Hier wurde gezeigt, dass die miR-155 beim B-Zell-Lymphom zusammen mit seinem Wirtsgen *Bic* hoch exprimiert vorliegt [103-104]. In verschiedenen Arbeiten wurde beobachtet, dass die miR-155 transkriptionell über denselben Promotor wie *Bic* reguliert wird [105-107]. Für mehrere Transkriptionsfaktoren wurde bereits gezeigt, dass sie in die Regulation der miR-155 involviert sind. So wurden NF- κ B und AP1 bei der inflammatorischen Antwort [105, 107] sowie für STAT5 beim subkutanen T-Zell-Lymphom [108] als essentielle Transkriptionsfaktoren am miR-155 Promotor beschrieben.

In ihrer nicht malignen Funktion wird die miR-155 in den frühen hämatopoetischen Stammzellen [109-110] sowie bei der inflammatorischen Antwort hoch exprimiert [105, 111-114]. Hier ist sie in die proliferativen Prozesse der HSCs (*self-renewal*) [110, 115] sowie in die Aktivierung und Ausreifung von lymphatischen und dendritischen Zellen involviert [105, 111-114]. In weiteren Arbeiten zum B-Zell-Lymphom wurde die miR-155 als onkogene miRNA beschrieben, die bei erhöhter Expression Proliferation induziert und zu einem aggressiveren Krankheitsverlauf führt [116-120]. Die miR-155 wurde auch bei verschiedenen soliden Tumoren wie beim hepatozellulären Karzinom [121], Mamakarzinom [122], Liposarkom [123], Glioblastom [124] sowie beim Larynxkarzinom [125] als Onkogen beschrieben.

Im hämatopoetischen System wurde gezeigt, dass die erhöhte Expression der miR-155 zu einer myeloproliferativen Erkrankung und zum Block der myeloiden Differenzierung führt [110, 126]. Zusätzlich wurde von verschiedenen Gruppen gezeigt, dass die miR-155 in der AML erhöht exprimiert vorliegt und mit der FLT3-ITD Mutation assoziiert ist [126-131]. In klinischen Studien wurde nachgewiesen, dass die erhöhte Expression der miR-155 beim Lymphom und bei der Leukämie mit einer schlechten Prognose assoziiert ist [132-133]. Bei verschiedenen Erkrankungen wurden bereits mehrere unterschiedliche Zielgene der miR-155 beschrieben. So wurde gezeigt, dass die miR-155 SHIP1 bei der AML [134] und beim B-Zell-Lymphom [118], FOXO3a beim Mamakarzinom [122], E2F2 beim Kolorektalkarzinom [135] und BACH1 beim Nierenkarzinom [136] supprimiert.

Studien zum therapeutischen Block der miR-155 mit *Locked nucleic acids* (LNAs) oder Nanopartikel gebundenen antimiRs zeigten im Mausmodell für ein B-Zell-Lymphom ein verlängertes Überleben und eine verringerte Tumorprogression [116, 120]. Durch die bereits publizierten Daten ergab sich die Hypothese, dass die miR-155 in der FLT3-ITD assoziierten AML zur Leukämieprogression beiträgt und somit ein neues therapeutisches Ziel darstellen könnte.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Software

Geräte

Affymetrix 428™ GeneChip Scanners
 a-Hyb™ Hybridization Station
 Autoklav Model 5050 EVL
 Bakterieninkubator
 Brutschrank, HeraCell 150i
 CCD-Kamera (G-Box)
 Durchflusszytometer BD FACSCalibur
 Elektrophoresesysteme
 Elektroporationsgerät Nucleofector® 2b Device
 Feinwaage AX4202
 Geldokumentation Gene Flash
 Kühlzentrifuge Heraeus Fresco 17
 Lichtmikroskop Axio Vert.A1
 Luminometer Lumat LB9705
 MACS® cell separation columns
 MACS® separator
 Mikrowelle
 Milli-Q-Anlage
 Nano-Photometer
 pH-Meter
 Pipetten 2µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl
 Pipettierhilfe
 Real Time PCR System 7500
 Real Time Thermal Cycler (Rotor-Gene™ 3000)
 Schüttelinkubator Model 3031
 Schüttler Rotamax 120
 Sterilbank Modell HeraSafe Heraeus
 Stromversorgung Power Pac 1000
 Thermal Cycler T100™
 ThermoCycler (T Gradient Thermoblock)
 Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic

Hersteller/ Vertrieb

Affimetrix
 Miltenyi, Biotec GmbH
 Tuttnauer
 Memmert GmbH
 Thermo Scientific
 Syngene Bioimaging
 BD Pharmingen™
 Bio-Rad Laboratories Inc.
 LONZA
 Sartorius
 Syngene Bioimaging
 Thermo Scientific
 Zeiss Deutschland
 Berthold Technologies
 Miltenyi Biotec
 Miltenyi Biotec
 Severin
 Millipore
 Implen
 Hanna Instruments
 Rainin; Eppendorf
 Integra Bioscience
 Applied Biosystems
 Corbett Research Australia
 GFL
 Heidolph
 Thermo Scientific
 Bio-Rad Laboratories Inc.
 Bio-Rad Laboratories Inc.
 Biometra®
 Bio-Rad Laboratories Inc.

Vortexer
Wasserbad

Fisher Scientific
GFL

Software

CellQuest™
Cyflogic 1.2.1
GenePix® Pro 6.0
Image J
SPSS17
Office

Hersteller/ Vertrieb

BD Pharmingen™
CyFlo Ltd
Molecular Devices
National Institutes of Health
IBM
Microsoft

2.1.2 Reagenzien

Chemikalien

Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30)
Agar
APS (Ammoniumperoxodisulfat)
β-ME (β-Mercaptoethanol)
Protein Assay Dye Reagent
BSA (Bovine serum albumin) purified
CaCl₂ (Calciumchlorid)
CEP701
DEPC (Diethylpyrocarbonat)
DMSO (Dimethylsulfoxid)
dNTPs
DTT (Dithiothreitol)
ECL Westernblot Detektionsreagenzien
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)
Ethanol
Ethidiumbromid
Formaldehyd
GelRed™ *Nucleic Acid Gel Stain*
Giemsa
Glycerin
Glycerol

Hersteller/ Vertrieb

Carl Roth GmbH
Carl Roth GmbH
Carl Roth GmbH
Sigma-Aldrich
Bio-Rad Laboratories Inc.
SERVA Electrophoresis GmbH
Carl Roth GmbH
LC-Laboratories
Carl Roth GmbH
Sigma-Aldrich
QIAGEN
Sigma Aldrich
Amersham Bioscience
Carl Roth GmbH
Carl Roth GmbH
Sigma-Aldrich
Carl Roth GmbH
Biotium Inc.
Carl Roth GmbH
Sigma-Aldrich
Sigma-Aldrich

HCl (Salzsäure)	Carl Roth GmbH
Hefe	Carl Roth GmbH
HEPES (Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure)	Carl Roth GmbH
Isopropanol	Carl Roth GmbH
May-Grünwald-Lösung	Sigma-Aldrich
Milchpulver	Carl Roth GmbH
Methanol	Carl Roth GmbH
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Carl Roth GmbH
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth GmbH
Na ₂ HPO ₄ (Natriumhydrogenphosphat)	Carl Roth GmbH
Phosphatase-, Proteinase Inhibitor Cocktails	Sigma-Aldrich
PKC412	LC-Laboratories
PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)	Sigma-Aldrich
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Fluka
Ponceau S	Sigma-Aldrich
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH
STAT5 Inhibitor	Merck-Millipore
SU5614	LC-Laboratories
Temed (Tetramethylethyldiamin)	Bio-Rad Laboratories GmbH
Tris-Base (Trisaminomethan)	Carl Roth GmbH
Tris-HCl	Carl Roth GmbH
Triton-X-100	Carl Roth GmbH
TRIzol ®	Invitrogen
Tween®20	Carl Roth GmbH

Zytokine

rHu M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*)
 IL-3 (Interleukin-3)
 IL-6 (Interleukin-6)
 rHuSCF (*Recombinant Human Stem Cell Factor*)
 rHuFlt3 (*Recombinant Human Flt3-Ligand*)

Hersteller/ Vertrieb

ImmunoTools GmbH
 ImmunoTools GmbH
 ImmunoTools GmbH
 PAN™ Biotech GmbH
 PAN™ Biotech GmbH

Medien und Zusätze

Ampicilin
 Blastocidin
 DMSO (Dimethylsulfoxid)
 DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
 FBS (Fötale Kälberserum)
 IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*)
 Penicillin/Streptomycin (P/S)
 PBS (*Phosphate buffered saline*)
 Polybren
 Puromycin
 RPMI 1640 (\pm Phenolrot)

Hersteller/ Vertrieb

Carl Roth GmbH
 Carl Roth GmbH
 Sigma-Aldrich
 PAA Laboratories GmbH
 PAA Laboratories GmbH
 Gibco®
 Gibco®
 PAA Laboratories GmbH
 Takara
 MP Biomedicals
 PAA Laboratories GmbH

Kommerzielle Kits

AMAXA™ Cell line Nucleofector® Kit V
 AMAXA™ Cell line Nucleofector® Kit L
 AMAXA™ Cell line Nucleofector® Kit C
 Bio-Rad Protein Assay
 BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit
 CD34 Progenitor Cell Isolation Kit, human
 Dual Luciferase™ Reporter Assay Kit
 HiSpeed® Plasmid Maxi Kit
 Revert Aid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit
 Lipofectamin™ LTX Reagent
 miRCURY™ LNA microRNA Array microarray kit
 miRCURY™ LNA microRNA Array Labeling kit
 PEG-it™ *Lentiviral Precipitation Solution*
 pPACKH1 HIV *Lentivector Packaging Kit*
 QuantiTect® SYBR Green PCR Kit
 QIAEX® II Gel Extraction Kit
 QIAprep® Spin Miniprep Kit
 QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit
 TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit
 TOPO® TA cloning Kit for subcloning

Hersteller/ Vertrieb

Lonza
 Lonza
 Lonza
 Bio-Rad Laboratories GmbH
 Invitrogen™
 Milteny Biotec
 Promega GmbH
 QIAGEN
 Thermo Scientific
 Invitrogen™
 EXIQON A/S
 EXIQON A/S
 System Biosciences
 System Biosciences
 QIAGEN
 QIAGEN
 QIAGEN
 Agilent Technologies
 Applied Biosystems
 Invitrogen™

Enzyme

Antarctic Phosphatase
 Phusion Polymerase
 Taq-Poymerase
 RNase A
 T4 DNA Ligase
 XBal

Hersteller/ Vertrieb

New England Bio Labs Inc.
 Finnzymes
 Promega GmbH rAPid Alkaline
 Sigma Aldrich
 Thermo Scientific
 Thermo Scientific

Marker und Ladepuffer

6x Loading Dye Solution
 GeneRuler™ DNA Ladder Mix
 Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder

Hersteller/ Vertrieb

Thermo Scientific
 Thermo Scientific
 Thermo Scientific

Vektoren

pcDNA3.1
 pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR
 pcDNA™6.2-GW/EmGFP-neg (pcDNA6.2-scr)
 pCR-2.1®-TOPO®-Vector
 pGL3 (Firefly Luziferase Reporter Vektor)
 pRL (Renilla Luziferase Reporter Vektor)
 pmiRZip-scr.
 pmiRZip-155
 pPACKH1 *Packaging Plasmid Mix*

Quelle

Invitrogen™
 Invitrogen™
 Invitrogen™
 Invitrogen™
 Promega GmbH
 Promega GmbH
 System Biosciences
 System Biosciences
 System Biosciences

pcDNA3.1-p65

Dr. S. Schwind, Abteilung für
 Hämatologie und Onkologie,
 Universitätsklinikum Leipzig

pcDNA3.1-PU.1

Prof. D. G. Tenen, Havard
 Stem Cell Institute, Havard
 Medical School, Boston [137]

pMX-STAT5A-IRES-EGF

Prof. T. Kitamura Institute of

pMX-STAT5A1*6-IRES-EGF

Medical Science, University of
 Tokyo [138]

pAL-FLT3-WT	Prof. T. Fischer, Klinik für Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R. [54]
pAL-FLT3-TKD	
pAL-FLT3-ITD	
pGL3-1783	Prof. M. Mallardo, Department of Biochemistry and Medical Biotechnologies, University of Naples Federico II [105]
pGL3-1380	
pGL3-1065	

Oligonukleotide

Für die Detektion der Expression der miR-155, snoRNA135 und RNUB6 wurden die spezifischen TaqMan® MicroRNA Assays verwendet. Alle weiteren aufgelisteten Primer wurden manuell designt und von Biomers.net GmbH bezogen.

Klonierung

Für die Klonierung des pRL-PU.1-3'UTR-Wt Luziferasekonstruktes wurde die Wildtyp PU.1-3'UTR von humaner genomischer DNA amplifiziert und nach einer Zwischenklonierung in den pCR-2.1®-TOPO®-Vector, in die XbaI Restriktionsstelle des pRL Vektors inseriert. Für die Amplifikation der PU.1 -3'UTR wurden folgende Primer verwendet:

PU.1-3'UTR XbaI for	5'-TCT AGA TAC GAC TTC AGC GGC GAA GTG CTG-3'
PU.1-3'UTR XbaI rev	5'-GGC CGG GCG AGG GCT AAT TAT TAT GGC AG-3'

Die Mutagenese der PU.1-3'UTR wurde mit dem QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Für die Mutagenese wurde der pRL-PU.1-3'UTR-Wt Vektor genutzt. Es wurden folgende Primer verwendet:

PU.1-3'UTR-Mut for	5'-CTG CCA TAA TAA TTA GCC CTC GCC CGG CC-5'
PU.1-3'UTR-Mut rev	5'-GGC CGG GCG AGG GCT AAT TAT TAT GGC AG-5'

Die Klonierung des pcDNA6.2-miR-155 Vektors wurde anhand des BLOCK-iT Pol II miR RNAi Expression Vector Kit durchgeführt. Hierzu wurden die folgenden Oligonukleotide gemäß des Herstellerprotokolls in den pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR Plasmid ligiert.

miR-155-top	5'-TGC TGT TAA TGC TAA TCG TGA TAG GGG TTT TTG CCT CCA ACT GAC TCC TAC ATA TTA GCA TTA A-3'
miR-155-bottom	5'-CCT GTT AAT GCT AAT ATG TAG GAG TCA GTT GGA GGC AAA AAC CCC TAT CAC GAT TAG CAT TAA C-3'

Alle Vektoren wurden mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit untersucht.

Sequenzierung

pRL	
Luc-C -for	5'-AGA GAG ATC CTC ATA AAG GC-3'
EBV-rev	5'-GTG GTT TGT CCA AAC TCA TC-3'
pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR	
miRNA for. Seq.	5'-TCC CAA GCT GGC TAG TTA AG-3'
miRNA rev Seq.	5'-CTC TAG ATC AAC CAC TTT GT-3'
pCR-2.1®-TOPO®-Vector	
M13 for	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'
M13 rev	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'

Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

Für die ChIP Analysen der p65 Bindung am miR-155 Promotor wurden folgende Primer verwendet:

p65 ChIP 1786-for	5'-TTC TGG GGA TGA AAG GTC AC-3'
p65 ChIP 1786-rev	5'-CCT GCT CAG ATC CAT GT-3'
p65 ChIP 1380-for	5'-TGC TCC CAA GTT CCT TAA CC-3'
p65 ChIP 1380-rev	5'-GTG ACT GGG GCC TTT TTG TA-3'

LNAs und siRNAs

miRCURY LNA™ hsa-miR-155 Inhibitor	EXIQON A/S
miRCURY LNA™ mmu-miR-155 Inhibitor	EXIQON A/S
miRCURY LNA™ negative control A	EXIQON A/S
All Stars Negative Control siRNA (SI03650318)	Qiagen
p65 siRNA (SI00301672)	Qiagen
STAT5 siRNA (SI03045014)	Qiagen

Antikörper**Western Blot Primärantikörper**

		Hersteller/ Vertrieb
Anti-human-GAPDH (FL-335)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-human-p65 (C-20)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-human-PU.1 (T-21)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-human-STAT5 (C17)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-human-pSTAT5 (Tyr694)	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling

Western Blot Sekundärantikörper

		Hersteller/ Vertrieb
HRP- Anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Santa Cruz Biotechnology

Durchflusszytometrie Antikörper

		Hersteller/ Vertrieb
PE-konjugierter anti-human-CD11b	Maus IgG _{1,k}	BD Pharmingen™
PE-konjugierter anti-human-CD14	Maus IgG _{1,k}	BD Pharmingen™
PE-konjugierter anti-human-CD15	Maus IgG _{1,k}	BD Pharmingen™
PE-konjugierter anti-human-CD34	Maus IgG _{1,k}	BD Pharmingen™
FITC-konjugierter anti-human-CD38	Maus IgG _{1,k}	BD Pharmingen™
PE-konjugierter anti-human-CD135	Maus IgG _{1,k}	BD Pharmingen™
PE-konjugierte IgG-Isotyp	Maus IgG _{1,k}	BD Pharmingen™

ChIP Antikörper

		Hersteller/ Vertrieb
Anti-human-p65 X (C-20)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
normales Kaninchen IgG	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology

2.1.3 Biologische Materialien

Bakterien

One Shot® TOP 10
 Subcloning Efficiency™ *DH5α*™
 XL1-Blue

Hersteller/ Vertrieb

Invitrogen™
 Invitrogen™
 Agilent Technologies

C57BL/6 Maus

In C57BL/6 Mäusen wurde die Expression der miR-155 analysiert. Die gesorteten Knochenmarksproben der Mäuse wurden durch Dr. V. Madan vom Cancer Science Institute der Nationaluniversität von Singapur zur Verfügung gestellt. Die Knochenmarkszellen wurden mittels FACS ARIA nach LSK (Lin⁻ Sca1⁺ cKit⁺), CMP (allgemeine myeloide Vorläufer), GMP (Granulozyten-Makrophagen Vorläufer), MEP (Megakaryozyten-Erythrozyten Vorläufer) und Granulozyten sortiert. Es wurden 3 unabhängige Experimente mit einem Pool von je 3-4 Mäusen analysiert. Die RNA-Präparation sowie die Expressionsanalysen der miR-155 und snoRNA135 mittels quantitativer Real-Time-PCR wurden am Universitätsklinikum Leipzig durchgeführt.

FLT3-ITD assoziiertes STAT5 *Knockout* Mausmodell

Die Mäuse wurden von Dr. Rebekka Dechow aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Justus Duyster an der Technischen Universität München / Klinikum Rechts der Isar etabliert. Dazu wurde das Knochenmark von Mx1-cre STAT5^{flox/flox} bzw. Kontroll- STAT5^{flox/flox} BALB/c Mäusen isoliert und mittels retroviraler Transduktion mit FLT3-ITD infiziert. Die infizierten Zellen wurden anschließend in letal bestrahlte BALB/c Mäuse transplantiert. Zur Induktion des Mx1-cre vermittelten STAT5 *Knockouts*, wurde den Mäusen 250 µg HMW polyinosinic:polycytidylic acid (pipC), an Tag 11, 14, 18 und 21 nach der Transplantation, intraperitoneal injiziert. Der vollständige STAT5 *Knockout* konnte am Tag 22 nach der Transplantation beobachtet werden. Durch Injektion von pipC wurde der Promotor der Mx1-cre Rekombinase und somit der STAT5 *Knockout* induziert.

C3H Mäuse

Die C3H Mäuse wurden als Mausmodell verwendet um den miR-155 Block als therapeutischen Ansatz in der FLT3-ITD assoziierten AML zu untersuchen. Es wurden C3H Mäuse verwendet, da diese syngen zu den verwendeten 32D Zellen sind. Die Tiere wurden von Charles River bezogen. Die Arbeiten mit den Tieren fanden am Max Bürger Zentrum in Leipzig in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Stefan Fricke vom Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie statt.

primäre humane Zellen

Die primären humanen CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen wurden aus Leukapherisaten mittels Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation und Purifikation durch immunmagnetische Antikörper mittels CD34 Progenitor Cell Isolation Kit gewonnen. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Reinheit der isolierten Zellen überprüft. Die Reinheit lag durchschnittlich bei 83 % CD34+ Zellen.

Patientenproben

Für die vorliegende Arbeit wurden bei 60 AML-Patientenproben sowie bei 3 Proben von gesunden Spendern die Expression der miR-155 analysiert. Hierzu wurde die RNA aus dem Knochenmark mittels TRIzol® extrahiert.

Die AML Patientenproben wurden, mit schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten entsprechend der Deklaration von Helsinki, vom Universitätsklinikum Münster und vom Universitätsklinikum Leipzig zur Verfügung gestellt. Die Proben der gesunden Spender stammen vom Universitätsklinikum Leipzig. Die Studienprotokolle zur Sammlung von AML Patientenproben wurden durch die zuständigen Ethikkomitees geprüft. Alle Proben wurden zytogenetisch und molekular analysiert. Es handelte sich um hauptsächlich um die AML Subtypen: zytogenetisch normaler und komplexer Karyotyp, Translokation t(15;17), Translokation t(8;21), Inversion inv(16). Des Weiteren erfolgte eine Einteilung der Proben nach ihrem FLT3-Status. Eine Auflistung der verwendeten Proben sowie alle bekannten Details sind in (Tabelle 2) dargestellt.

Tabelle 2: Charakteristika der verwendeten Patientenproben

Patient Nr.	Karyotyp	FLT3-Status	Alter	Geschlecht	Material
AML					
1	normaler Karyotyp	WT	21	m	Knochenmark
2	normaler Karyotyp	TKD	39	w	Knochenmark
3	normaler Karyotyp	TKD	58	w	Knochenmark
4	normaler Karyotyp	WT	43	w	Knochenmark
5	normaler Karyotyp	TKD	58	m	Knochenmark
6	komplexer Karyotyp	ITD/TKD	29	m	Knochenmark
7	komplexer Karyotyp	ITD	30	w	Knochenmark
8	t(8;21)	ITD	42	m	Knochenmark
9	t(8;21)	ITD/TKD	67	m	Knochenmark
10	normaler Karyotyp	ITD	70	w	Knochenmark
11	komplexer Karyotyp	WT	51	w	Knochenmark
12	Trisomie 22, inv(16), CBF?-MYH11 pos	WT	60	w	Knochenmark
13	unbekannt	WT	48	m	Knochenmark
14	del(5), t(15;17)	WT	31	w	Knochenmark
15	Trisomie 8; t(15;17)	TKD	23	w	Knochenmark
16	Trisomie 8; t(15;17)	WT	50	m	Knochenmark
17	t(15;17)	WT	70	m	Knochenmark
18	t(15;17)	WT	71	w	Knochenmark
19	inv(16)	TKD	39	m	Knochenmark
20	inv(16)	TKD	42	m	Knochenmark
21	inv(16)	TKD	29	m	Knochenmark
22	inv(16)	TKD	41	w	Knochenmark
23	inv(16)	WT	45	w	Knochenmark
24	t(8;21)	WT	36	w	Knochenmark
25	del(7), t(8;21)	WT	26	m	Knochenmark
26	del(9), t(8;21)	WT	53	w	Knochenmark
27	t(8;21)	WT	42	m	Knochenmark
28	del(7), inv(16)	TKD	40	m	Knochenmark
29	normaler Karyotyp	ITD	61	m	Knochenmark
30	normaler Karyotyp	ITD	17	w	Knochenmark
31	normaler Karyotyp	ITD	26	m	Knochenmark
32	normaler Karyotyp	ITD	67	w	Knochenmark
33	normaler Karyotyp	ITD	72	m	Knochenmark
34	normaler Karyotyp	ITD	77	w	Knochenmark
35	normaler Karyotyp	ITD	48	w	Knochenmark
36	normaler Karyotyp	ITD	71	m	Knochenmark
37	normaler Karyotyp	WT	44	m	Knochenmark
38	normaler Karyotyp	WT	61	m	Knochenmark
39	normaler Karyotyp	WT	71	w	Knochenmark
40	normaler Karyotyp	WT	72	m	Knochenmark
41	normaler Karyotyp	WT	69	m	Knochenmark
42	normaler Karyotyp	WT	57	w	Knochenmark
43	normaler Karyotyp	WT	78	m	Knochenmark
44	komplexer Karyotyp	WT	64	w	Knochenmark
45	normaler Karyotyp	WT	72	m	Knochenmark
46	normaler Karyotyp	WT	63	m	Knochenmark
47	normaler Karyotyp	WT	66	w	Knochenmark
48	normaler Karyotyp	WT	72	w	Knochenmark
49	normaler Karyotyp	WT	70	w	Knochenmark
50	normaler Karyotyp	WT	65	m	Knochenmark
51	normaler Karyotyp	WT	49	w	Knochenmark
52	normaler Karyotyp	WT	65	w	Knochenmark
53	normaler Karyotyp	WT	72	w	Knochenmark
54	normaler Karyotyp	ITD/TKD	60	w	Knochenmark
55	normaler Karyotyp	ITD	66	w	Knochenmark
56	normaler Karyotyp	ITD	67	m	Knochenmark
57	normaler Karyotyp	ITD	63	m	Knochenmark
58	normaler Karyotyp	ITD	59	m	Knochenmark
59	normaler Karyotyp	WT	52	m	Knochenmark
60	normaler Karyotyp	ITD	47	w	Knochenmark
Gesund					
61	normaler Karyotyp	WT	36	w	Knochenmark
62	normaler Karyotyp	WT	41	m	Knochenmark
63	normaler Karyotyp	WT	41	m	Knochenmark

Zelllinie**Quelle**

32D ^{FLT3-ITD}	murine, transformierte Knochenmarkzellen mit	Prof. C. Müller-Tidow
32D ^{FLT3-WT}	konstitutiver Expression des humanen FLT3-ITD bzw. humanen FLT3-WT	Klinik für innere Medizin IV, Universitätsklinikum Halle [54]
HEK 293T	humane, embryonale Nierenzellkarzinomzellen	DSMZ
MV4;11	humane, akute monozytische Leukämiezellen	DSMZ
U937	humane, histozytische Lymphomazellen	DSMZ
WEHI-3B	murine, myelomonozytäre Leukämiezellen	DSMZ

2.2 Methoden**2.2.1 Zellkultur**

Die Kultivierung der eukaryotischen Zelllinien sowie der primären CD34+-Zellen erfolgte nach Standardmethoden in den entsprechenden Kulturmedien. Die Inkubation der Zellen erfolgte in Begasungsinubator bei 37°C, 96 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO₂.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Verdünnung der Zellsuspension auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben, die Zellen in alle vier Quadranten (mit jeweils 16 Einzelquadranten) ausgezählt und anschließend auf das vorhandene Volumen der Zellsuspension umgerechnet.

Zusammensetzung der Kulturmedien

32D ^{FLT3-WT}	RPMI 1640 + 10 % FBS + 10 % WEHI Überstand + 15 mg/ml Blasticidin
32D ^{FLT3-ITD}	RPMI 1640 + 10 % FBS
CD34+	IMDM + 10 % FBS, 50 ng/µl rHuSCF, 50 ng/µl rHuFlt3 und 50 ng/µl IL-6, welches nach 3 Tagen durch 50 ng/µl IL-3 ersetzt wurde
HEK 293T	DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S
MV4;11	IMDM + 10 % FBS + 1 % P/S
U937	RPMI 1640 + 10 % FBS + 1 % P/S
WEHI-3B	RPMI1640 + 5 % FBS +50 µM β-Mercaptoethanol

2.2.2 Klonale Koloniewachstumsanalysen

Zur Analyse des klonalen Wachstums von 32D^{FLT3-ITD} Zellen nach Block der miR-155 wurden Koloniewachstumsassays durchgeführt. Der Assay ist ein funktioneller Test, der die Zahl koloniebildender Einheiten erfasst. Dazu wurden 5×10^3 Zellen in ein semifluides 1 %iges Methylcellulose-Medium eingebracht. Nach 12 Tagen wurden die sichtbaren Kolonien ausgezählt und fotografisch dokumentiert.

2.2.3 Gesamt-RNA-Extraktion

Zur RNA Präparation wurden 1×10^5 bis 1×10^6 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden bei 1000 rpm abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dann wurde das Zellpellet in 1 ml TRIzol® aufgenommen. Diese Lösung enthält Phenol und Guanidiniumthiocyanat in einphasiger Lösung. Anschließend wurden 200 µl Chloroform dazugegeben, die Proben 15 s lang kräftig geschüttelt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 15 min, bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Dies führte zur Auftrennung von drei Phasen: eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine milchige Interphase und eine obere farblose wässrige Phase. Die RNA reichert sich ausschließlich in der oberen wässrigen Phase an, während DNA und Proteine sich in der Interphase und der Phenol-Chloroform-Phase befinden. Die obere Phase mit RNA wurde daraufhin in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der RNA wurden 700 µl Isopropanol zugegeben und das Gemisch 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min, bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Dadurch wurde die gefällte RNA pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen. Zum Waschen der RNA wurde 1 ml 70 % iger Ethanol zugegeben und für 10 min, bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde anschließend luftgetrocknet und in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Die extrahierte RNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Konzentrationsbestimmung der RNA

Mit einem Spektralphotometer können Quantität und Qualität von Nukleinsäuren bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Die RNA-Konzentration wurde anhand photometrischer Absorptionsmessung und Berechnung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Der A_{260}/A_{280} Quotient für ausreichend reine RNA liegt bei $1,8 \pm 0,2$.

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* – PCR) ermöglicht eine hochspezifische Vervielfältigung, selbst geringster Mengen DNA. Bei einer PCR wird ein DNA-Fragment (*Template*) mit Hilfe von zwei, dem *Template* komplementären, synthetischen DNA-Oligonukleotiden (Primer) amplifiziert.

Eine PCR besteht aus mehreren Schritten. In der initialen Denaturierungsphase (5 min bei 95 °C, *Hot Start*) werden doppelsträngige DNA sowie gebildete Primerdimere aufgeschmolzen. Daran schließt sich eine Abfolge von 30-40 Zyklen mit folgenden Reaktionsschritten: Denaturierung (thermischem Aufschmelzen des *Templates* zu Einzelsträngen; 30-60 s bei 95 °C), *Annealing* (Primerhybridisierung an einzelsträngige *Template*-DNA; 30-60 s bei 50-66 °C) und Primerextension (30-60 s bei 72 °C). Durch die zyklische Wiederholung der Schritte kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation der Zielsequenz. Ein finaler Extensionsschritt (5 min bei 72 °C) soll unvollendete Extensionsschritte komplettieren. Die jeweils verwendeten Reaktionszeiten und Temperaturen sind von der Länge der Amplifikate und den spezifischen Sequenzen der verwendeten Primer abhängig.

Die PCR kann qualitativ und quantitativ eingesetzt werden, und wurde bei der RNA-Analyse, Klonierung, Mutagenese sowie ChIP-Analyse verwendet. Für Standardanwendungen wurde die hitzestabile *Taq*-DNA-Polymerase und bei der Klonierungen sowie für Mutagenese die *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet.

Reverse Transkription

Mittels retroviraler reverser Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, wird die mRNA (*messenger RNA*) in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben. Dies ermöglicht die PCR-Technik auch für die RNA-Analytik zu verwenden. Für die Reverse Transkriptase Reaktion wurde das Revert Aid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit verwendet. Für die RT-Reaktion wurde je Probe 200 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Der RNA wurden jeweils 1 µl Oligo-(dT)-Primer, 4 µl 5fach Reaktionspuffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 2 µl dNTP Mix (10 mM), 0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor und 1 µl Reverse-Transkriptase (200 Units, Revert Aid™ H Minus M-Mul V Reverse Transcriptase) sowie DEPC-Wasser zu einem Gesamtvolumen von 20 µl zugegeben. Die Reaktion im Thermo Cycler erfolgte bei 42 °C für 60 min. Durch Erhitzen auf 70 °C für 15 min wurde die Reaktion abgestoppt. Das entstandene cDNA-Gemisch wurde direkt für die PCR verwendet oder bei -20 °C gelagert.

Semiquantitative PCR

Die semiquantitative PCR wurde bei den ChIP Analysen verwendet. Für eine Standardreaktion wurde ein 20 µl Ansatz bestehend aus 2 µl cDNA, jeweils 1 µl des entsprechenden Primerpaares (10 pmol), je 2 µl dNTP-Mix (10 µM), 2 µl Reaktionspuffer, 2 µl MgCl₂ und 0,3 µl Taq-DNA-Polymerase (2,5 Units) und 9,7 µl DEPC-Wasser eingesetzt. Die PCRs wurde in einem ThermoCycler T Gradient Thermoblock bzw. Thermal Cycler T100 durchgeführt. Die Denaturierung erfolgte für 30 s bei 95 °C. Für die Amplifikation wurden 40 Zyklen und einer Annealing-Temperatur von 54 °C angewandt.

Quantitative Realtime PCR

Die quantitative Realtime-PCR ermöglicht die zeitgleiche Amplifikation von Sequenzen und ihre quantitative Analyse. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die nach jedem PCR-Zyklus erfasst werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende der PCR wird anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Für die Reaktionen wurde das QuantiTect® SYBR Green PCR Kit verwendet. SYBR Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich in die kleine Furche doppelsträngiger DNA einlagert. Mittels Messung der emittierten Fluoreszenz (proportional zur DNA-Menge) in der exponentiellen Phase kann der Anstieg des PCR-Produktes in Echtzeit erfasst werden. Am Ende der PCR lässt sich aus den gewonnenen Daten die exponentielle Phase bestimmen, in 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*).

Die Reaktionen erfolgten in einem Rotor-Gene™ 3000, Real Time Thermal Cycler sowie im Real Time PCR System 7500. Zur Normalisierung wurde die Expression von Referenzgenen gemessen, da diese konstant exprimiert werden. Als Referenzgen wurde bei der Analyse der miRNAs RNUB6 in den Zelllinien und AML-Patientenproben sowie snoRNA135 bei den Mausexperimenten verwendet. Bei der Messung der mRNA wurde das *housekeeping*-Gen *GAPDH* gemessen. Die Analysen der miRNA Expression wurde unter Verwendung der entsprechenden TaqMan® MicroRNA Assays nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Alle verwendeten Primer sind unter 2.1.2 (Oligonukleotide) aufgelistet.

Die Berechnung erfolgte nach der Delta-Delta- C_T ($\Delta\Delta C_T$)-Methode der relativen Quantifizierung, um das Verhältnis der Gruppen zueinander zu ermitteln. Dabei wird die Expression des Zielgens auf die Expression des konstitutiv exprimierten Referenzgens bezogen und aus den Delta- C_T -Werten (ΔC_T) beider Gruppen anschließend der Delta-Delta- C_T -Wert ($\Delta\Delta C_T$) gebildet. Um den Expressionsunterschied (*fold change*) zwischen den beiden Gruppen zu ermitteln wird dieser Wert anschließend in die Formel $2^{-\Delta(\Delta C_T)}$ eingesetzt [139].

$$\Delta C_T = C_{T, \text{Zielgen}} - C_{T, \text{Referenzgen}}$$

$$\Delta(\Delta C_T) = \Delta C_{T, \text{behandelt/ Patient}} - \Delta C_{T, \text{Kontrolle}}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta(\Delta C_T)}$$

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Analysen von semiquantitativen PCR Produkten sowie die präparative Isolierungen von DNA-Fragmenten wurden Agarosegele verwendet. Dazu wurden die ca. 20 μl PCR-Produkt / Probe mit 4 μl Ladepuffer gemischt und mittels eines 1,5 %igem Agarosegels elektrophoretisch nach Größe aufgetrennt. Durch das Anfärben der DNA mit interkalierendem Ethidiumbromid bzw. GelRed sowie die Verwendung eines DNA-Größenstandards wurden die DNA-Banden in einem Geldokumentationsgerät visualisiert und analysiert.

TAE-Puffer: 0,4 M Tris, 1,1 % Essigsäure, 2 % 0,5 M EDTA in destilliertem Wasser.

2.2.7 microRNA-Array

Microarrays erlauben die Untersuchung differentieller DNA bzw. RNA Expressionsmuster in unterschiedlichsten Zellpopulationen. Die Technologie der MicroRNA-Arrays basiert auf dem Gebrauch von *Locked Nucleic Acid* (LNA)-modifizierten Oligonukleotiden. LNA ist ein synthetisches RNA/DNA-Analogon, das sich nach Einbau in die Oligonukleotide durch erhöhte Thermostabilität der Nukleinsäureduplexe auszeichnet [140-141].

Die Erstellung des miRNA-Expressions-Profiles während der MCSF induzierten myeloiden Differenzierung von CD34⁺ Progenitorzellen wurde mittels miRCURY™ LNA microRNA Array Microarray Kit entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Auf dem microRNA-Array waren, gemäß miRBase 8.1 (Juli 2006) ,454 miRNA komplementäre

LNAs angeordnet. Nach Isolation der gesamten RNA, wurde diese mit den Fluoreszenzfarbstoffen Hy3™ und Hy5™ mittels miRCURY™ LNA microRNA Array Labeling kit nach Protokoll des Herstellers gelabelt. Anschließend wurden die gelabelten RNAs in der a-Hyb™ Hybridisation Station auf einen Array hybridisiert. Die gebundenen miRNAs wurden über die Bindung an die Fluoreszenzfarbstoffe Hy3™ und Hy5™ (entsprechend den Farbstoffen Cy3™ und Cy5™) mittels eines Affymetrix 428™ GeneChip Scanners detektiert. Die so erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Computerprogramms GenePix® Pro 6.0 sowie Excel ausgewertet.

2.2.8 Klonierung

Das Einbringen eines gewünschten DNA-Fragments in einen Vektor bezeichnet man als Klonierung.

Das gewünschte DNA-Fragment wird aus genomischer DNA oder cDNA mit Hilfe spezifischer Primer in einer PCR amplifiziert. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Detektion des gewünschten DNA-Fragments im Agarosegel wurde dieses ausgeschnitten und mittels QIAEX® II Gel Extraction Kit nach Protokoll des Herstellers isoliert, gegebenenfalls durch Restriktionsenzyme verdaut und in einer Ligasereaktion mittels T4-Ligase, nach Herstellerangaben, mit dem Vektor kovalent verknüpft. Anschließend wurden kompetente Bakterien mit dem Ligationsprodukt transformiert und auf Selektions Agar-Platten kultiviert. Einzelne Kolonien wurden gepickt und nach einer Mini-Plasmidpräparation mittels QIAprep® Spin Miniprep Kit nach Herstellerprotokoll, durch eine Sequenzierung die erfolgreiche Herstellung des gewünschten Konstrukts überprüft.

Für den Luziferase Vektor mit der PU.1-3'UTR wurde die 3'UTR Sequenz (369 bp) aus genomischer DNA der Zelllinie U937 amplifiziert und nach Zwischenklonierung in den pCR-2.1®-TOPO®-Vector, in die XbaI Restriktionsstelle 3' zum Luziferasegen des pRL-Vektor kloniert.

Für den Überexpressionsvektor der miR-155 wurde die Sequenz der reifen miR-155 in den pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR Plasmid mittels des BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kits nach Angaben des Herstellers kloniert.

Alle verwendeten Primer sind in unter 2.1.2 (Oligonukleotide – Klonierung) aufgelistet.

2.2.9 *In-vitro*-Mutagenese

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

Die Mutation des PU1-3'UTR Vektors (pRL-PU.1-3'UTR-Wt) erfolgte unter Verwendung des QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis kit entsprechend den Herstellerangaben. Der pRL-PU.1-3'UTR-Wt Vektor wurde mit spezifischen Primern (siehe 2.1.2 Oligonukleotide – Klonierung) in der miR-155 Binderegion mutiert. Hierfür wurden 4 Punktmutationen (Abbildung 32A) basierend auf der PCR-Technologie eingebaut. Durch Sequenzierung des mutierten Vektors (pRL-PU.1-3'UTR-Mut) wurde die erfolgreiche Mutation kontrolliert.

2.2.10 Gewinnung von Plasmiden

Plasmide sind kleine extrachromosomale, ringförmige, autonom replizierte, doppelsträngige DNA-Moleküle. Zur Gewinnung von Plasmiden wurden kompetente Bakterien mittels Hitzeschock (entsprechend des Herstellerprotokolls) transformiert. In der Regel kodieren Plasmide ein Antibiotikaresistenzgen, das ein selektives Wachstum der Plasmid enthaltenden und exprimierenden Bakterien ermöglicht. Die Bakteriensuspension wurde in Petrischalen mit entsprechendem Antibiotikum versetztem LB-Agar aufgetragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit einer Impföse eine Kolonie entnommen und in 200 ml Ampicillin (50 µg/ml) versetztem LB-Flüssigmedium für 12-16 h bei 37 °C und konstantem Schütteln (200 rpm) inkubiert. Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurde das HiSpeed® Plasmid Maxi Kit bzw. EndoFree® Plasmid Maxi Kit folgend den Herstellerangaben durchgeführt.

LB-Medium: 1 % Bacto-Trypton; 1 % NaCl; 0,5 % Bacto-Hefeextrakt in destillierten Wasser.; autoklaviert; pH 7,0

LB-Agarplatten: 1,5 % Bactoagar in LB-Medium; autoklaviert

2.2.11 Transiente Transfektion

Das zeitweilige Einbringen von Plasmiden oder Oligonukleotiden in eine eukaryotische Zelle bezeichnet man als Transfektion. Es wurden verschiedene Transfektionsmethoden wie Lipofektion und Elektroporation verwendet. Diese Methoden zeigen eine sehr hohe Effektivität bei der Transfektion von Suspensionszellen.

Lipofektion mit Lipofectamin™ LTX

Bei der Lipofektion werden Ülasamide oder Oligonukleotide mit Hilfe von Liposomen eingeschleust. Die Liposomen fusionieren mit der Zellmembran und ermöglichen so den Transport der DNA ins Zellinnere.

Die Lipofektion wurde für die Transfektion der adhärennten 293T Zellen für die Luziferaseassays bzw. Virusproduktion verwendet. Die Transfektion erfolgte entsprechend dem Herstellerprotokoll. Die Transfektionseffizienz lag bei 90-100 %.

Elektroporation mit AMAXA™ Nucleofector Cell line Kit

Bei der Elektroporation wird mittels eines kurzen elektrischen Pulses eine kurzzeitig erhöhte Permeabilität der Zellmembran erzeugt, die eine Diffusion von Plasmiden oder Oligonukleotiden ins Zellinnere ermöglicht.

Für die Transfektion wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll 1×10^6 Suspensionszellen sowie 2 µg Plasmid eingesetzt. Bei der Transfektion von LNAs wurden 200 nM bzw. 160 nM siRNA verwendet. Die Transfektionseffizienzen wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht und lagen bei U937 Zellen zwischen 50-60 %, bei MV4;11 Zellen zwischen 40-60 % und bei 32D Zellen bei ca. 80 %.

2.2.12 Pappenheim-Färbung (May- Grünwald- Giemsa)

Zur morphologischen Analyse von Zellen wurde die May-Grünwald-Färbung nach Pappenheim angewandt. Dazu wurden 10000-50000 Zellen mittels Zentrifugation (5 min bei 1000 rpm auf einem Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden anschließend für 5 min in einer Färbewanne mit May- Grünwald inkubiert und danach mit PBS gewaschen. Dann wurden die Objektträger für 15 min in einer 1:15 verdünnten Giemsalösung inkubiert. Zum Abschluß wurden die Objektträger mit PBS und mit destilliertem Wasser gewaschen.

2.2.13 Gewinnung des miRZip-155 Lentivirus

293T Zellen wurden mittels Lipofectamin LTX mit dem pmiRZip-155 bzw. pmiRZip-scr und dem Verpackungsplasmidmix pPACKH1 entsprechend dem Hertsellerprotokoll transfiziert. Da das Virus in das Kulturmedium der Zellen abgegeben wird, wurde der Überstand 24 und 48 h nach der Transfektion gesammelt, und sterilfiltriert. Anschließend wurde das Virus mit der PEG-it Virus Präzipitationslösung und Zentrifugation pelletiert. Das Viruspellet wurde anschließend in 50 µl Medium aufgenommen. Das Virus wurde entweder direkt auf die zu transduzierenden Zellen gegeben oder bei -80 °C gelagert.

2.2.14 Transduktion der Zellen mit dem Lentivirus

Bei der Transduktion (auch Infektion) von Lentiviren wird Fremd-DNA in die Zellen eingebracht, die durch Integration ins zelluläre Genom zu einer stabilen Expression des Zielgens führt. Lentiviren sind eine Gattung innerhalb der Retroviren, die im Gegensatz zum Gammaretrovirus den Vorteil haben auch nicht teilungsaktive, eukaryotische Zellen zu infizieren.

Für die lentivirale Transduktion wurden $5 \cdot 10^5$ 32D^{FLT3-ITD} Zellen je Ansatz ausplattiert und an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit dem Lentivirus behandelt. Dem Kulturmedium wurde Polybren zugegeben, um die Infektionseffizienz zu erhöhen. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Fluoreszenz des GFP-Markers ermittelt und die Transduktionseffizienz des Lentivirus bestimmt. Diese lag im Durchschnitt 30-50 %. Mittels durchflusszytometrischer Sortierung bzw. Antibiotika Selektion wurden die infizierten Zellen auf 100 % angereichert.

2.2.15 Luziferase-Reporter-Assay

Mittels Reportergenkonstrukten kann die Genexpression bzw. die Promotoraktivität untersuchen und quantitativ analysieren. Als Reportergene verwendet man vornehmlich Gene, 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. Beim Dual-Luciferase™ Reporter-Assay-System werden innerhalb eines Systems zwei verschiedene Luziferasen simultan exprimiert und gemessen: zum einen, die Firefly (*Photinus pyralis*)-Luziferase, die als Reporter im verwendeten Luziferase-Reporterkonstrukt vorhanden ist, und zum anderen die Renilla (*Renilla reniformis*)-Luziferase, die unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors steht und so als Kontrollreporter (pRL0) zur Normalisierung dient. Die Aktivität

des Luziferase-Reporterkonstrukts korreliert mit dem Effekt der untersuchten Faktoren auf die spezifische Genexpression. Der Dual-Luciferase™ Reporter-Assay wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Bei den Promotoraktivitätsassays wurden die Vektoren wie folgt transfiziert: Luziferasereporterkonstrukt pGL3 0,7 µg, pRL 0,1 µg und Überexpressionskonstrukt (pcDNA3.1 bzw. pMX) 0,2 µg. Für die Untersuchung der miR-155 Bindung an der PU.1-3'UTR wurden folgende Vektoren eingesetzt: pRL-PU.1-3'UTR 0,7 µg, pGL3 0,3 µg und pcDNA6.2 Konstrukt 1 µg.

2.2.16 Durchflusszytometrie (FACS)

Zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen, Peptiden und DNA wird das Verfahren der Durchflusszytometrie angewendet. Das grundlegende Prinzip ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten spezifischen Antikörpern durchgeführt wird. Die Antikörper sind meist gegen bestimmte Oberflächenproteine (z.B. Proteine der CD-Klassifizierung) gerichtet.

Um die Expression spezifischer Oberflächenantigene zu bestimmen, wurden Zellen für 20 Minuten mit den entsprechenden Fluorochrom-markierten Antikörpern inkubiert. Durch die Anregung mittels Laser verschiedenener Wellenlängen konnte die Bindung der Fluorochrom konjugierten Antikörper analysiert werden. Zur Bestimmung von Transfektions- bzw. Transduktionseffizienzen wurden die Zellpopulationen mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie analysiert. Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit der CellQuest-Software bzw. Cyflogic.

2.2.17 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays durch photometrische Messung der Absorption bei 595 nm nach Bradford gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand einer Eichkurve, aus BSA-Lösungen mit bekannter Konzentration, errechnet.

2.2.18 Elektrophoretische Auftrennung der Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel

Proteine lassen sich entsprechend ihrer jeweiligen Molmasse in einer diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese auftrennen. In einem vertikalen Gelelektrophoresesystem

passieren die Proben zunächst ein Sammelgel zur Vortrennung sowie Aufkonzentrierung und anschließend ein Trenngel, wo sich die Proteine aufgrund ihrer molekularen Größe trennen. 30-90 µg Proteinlösung, welche die zu trennenden Proteine enthielt, wurde mit Ladepuffer gemischt und anschließend sofort für 10 min bei 95 °C hitzedenaturiert. Die Proteine sowie eine farbstoffmarkierter Größenstandardt (Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder) als zur Molekulargewichtsabschätzung, wurden auf das Gel geladen und durch Anlegung einer Spannung von 200 V für 1 h aufgetrennt.

Trenngel: 5-15 % Polyacrylamid-Lösung; 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1 % SDS; 0,3 % APS; 0,1 % TEMED

Sammelgel: 5 % Polyacrylamid-Lösung; 12,5 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1 % SDS; 0,3 % APS; 0,1 % TEMED

SDS-Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS in destilliertem Wasser

2.2.19 Western-Blot

Im Anschluss an die Gelelektrophorese erfolgt der Western-Blot (auch Immunoblot). Beim Western Blot werden die aufgetrennten Proteine elektrophoretisch, durch Anlegen einer Spannung von 150 mA für 50 min, aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose- bzw. PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran überführt und fest an diese gebunden. Anschließend wurde die Membran mittels Ponceau-S angefärbt, um die Effizienz des Blot-Vorgangs zu überprüfen. Vor der Nachweisreaktion wurde die Membran mithilfe von 5 %iger Trockenmilch abgesättigt, um überschüssige Proteinbindestellen zu saturieren und unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Zum Nachweis der Proteine wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit spezifischen gegen die nachzuweisenden Proteine gerichteten Primärantikörpern inkubiert. Dann wurde die Membran mit PBST gewaschen und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur mit einem sekundären gegen konstante Bereiche des ersten Antikörpers gerichteten Antikörpern inkubiert. Der Sekundärantikörper ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (*HRP – horseradish peroxidase*) konjugiert, die durch Wasserstoffperoxid oxidiert und anschließend in dieser Form mit Luminol reagiert, was eine Chemilumineszenz bewirkt. Durch Detektion der Chemilumineszenz als Schwarzfärbung auf einem Röntgenfilm oder mittels CCD-Kamera, kann die Expression spezifischer Proteine sichtbar gemacht werden. Zur Quantifizierung der Bandenintensität wurde die Software ImageJ genutzt.

Transferpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS; 20 % Methanol in destilliertem Wasser.

2.2.20 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Mit Hilfe der Chromatin-Immunopräzipitation kann die Protein-DNA-Interaktionen im Chromatinkontext lebender Zellen analysiert werden. Die zu einem bestimmten Zeitpunkt bestehenden Protein-DNA-Komplexe in den Zellen wurden mittels Formaldehyde fixiert, und so reversible quervernetzt. Die Zellen wurden anschließend mittels Ultraschall aufgeschlossen und die DNA in 200 – 1000 Basenpaar (bp) Fragmente geschert. Über spezifische Antikörper wurden Protein-DNA-Komplexe gebunden und über Agarose Beads aufgereinigt. Nach der Aufreinigung wurde die Veretzung der Proteine und der DNA gelöst und die Proteine mit Hilfe von Proteinase K verdaut. Die DNA wurde dann mittels spezifischer Primer in einer semiquantitativen PCR analysiert, um zu bestimmen welche DNA-Fragmente einen Komplex mit dem entsprechenden Protein gebildet haben.

Um die Bindung von NF- κ B (p65) im Promotorbereich des *miR-155* Gen zu untersuchen, wurden MV4;11 Zellen genutzt. Für die ChIP Analysen wurde ein Protokoll des *Epigenome Network of Excellence* verwendet: http://www.epigenome-noe.net/researchtools/protocol.php_protid=10.html. Die spezifischen Primer wurden entsprechend den putativen NF- κ B Bindestellen im Promotorbereich der miR-155 designt. Alle verwendeten Primer sind unter 2.1.2 (Oligonukleotide - Chromatin-Immunopräzipitation) aufgelistet. Die verwendeten Antikörper sind unter 2.1.2 (Antikörper – ChIP-Antikörper) aufgeführt.

2.2.21 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde der Student *t* Test für unabhängige und unverbundene Stichproben verwendet (Excel). Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p kleiner als 5 % ($p \leq 0.05$) wurde das Ergebnis als statistisch signifikant gewertet. Wurde dieses Niveau erreicht, sind die Werte in den Abbildungen durch Sterne gekennzeichnet: $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **. Die Ergebnisse wurden bei mehr als zwei unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Balkendiagramme wurden mit Excel und die Box-Whisker- Plots mit SPSS 19 erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 MicroRNA Expressionsanalyse während der MCSF induzierten Differenzierung von CD34⁺/CD38⁺ Progenitorzellen

3.1.1 Etablierung eines MCSF induzierten Differenzierungsmodells von CD34⁺/CD38⁺ Progenitorzellen

Um die miRNA Expression während der MCSF induzierten myeloiden Differenzierung von pluripotenten myeloiden Progenitorzellen zu analysieren, musste ein Differenzierungsprotokoll etabliert werden. Dazu wurden CD34⁺/CD38⁺ Zellen mittels MACS[®] Separation aus Leukapherisaten selektiert. Die isolierten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Oberflächenmarker CD34 und CD38 untersucht. In den Analysen konnte gezeigt werden, dass die isolierten Zellen im Mittel 83,4 % CD34 /CD38 positiv waren und somit den pluripotenten hämatopoetischen Progenitorzellen entsprachen (Abbildung 5).

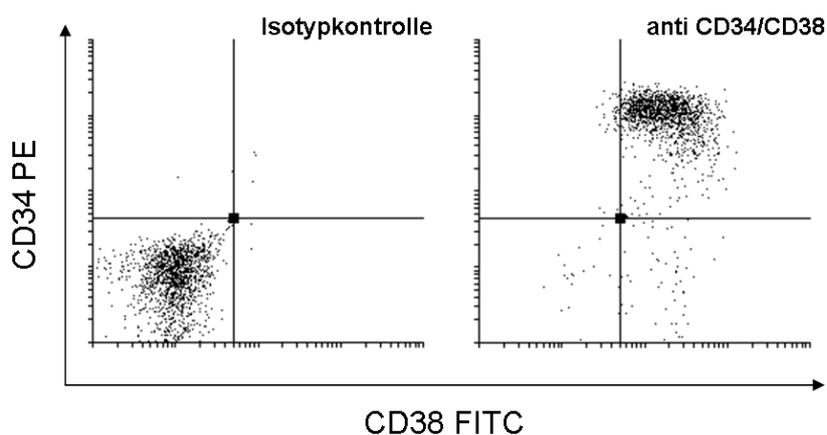


Abbildung 5: Durchflusszytometrische Analyse der aufgereinigten CD34⁺ Zellen. Die Zellen wurden nach der immunomagnetischen Aufreinigung aus Leukapherisaten mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von CD34 und CD38 untersucht. Die Abbildung zeigt die Isotypkontrolle (links) im Vergleich zu den anti CD34 und anti CD38 Antikörper inkubierten Zellen. Die separierten Zellen zeigten eine Reinheit von ca. 83 %.

Um das Differenzierungspotenzial der CD34⁺ Progenitorzellen zu analysieren, wurden die Zellen bis Tag 3 in RPMI1640 Medium mit 10 % FBS, 50 ng/ml SCF, 50 ng/ml FL und 50 ng/ml IL-6 mit unterschiedlichen MCSF Konzentrationen (0 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml) kultiviert. Ab dem 4. Tag wurden die Zellen

in RPMI1640 Medium mit 10 % FBS, 50 ng/ml SCF, 50 ng/ml FL und 10 ng/ml IL-3 mit den angegebenen MCSF Konzentrationen kultiviert. Die Zellen wurden an Tag 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15 und 18 mittels Durchflusszytometrie auf die Expression des Stammzellmarkers CD34 bzw. auf die differenzierungsassoziierten Oberflächenmarker CD11b, CD14 und CD15 analysiert (Abb. 2-5). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des hämatopoetischen Stammzell-assoziierten Oberflächenmarkers CD34 unabhängig von der MCSF-Konzentration stark abnahm (Abbildung 6).

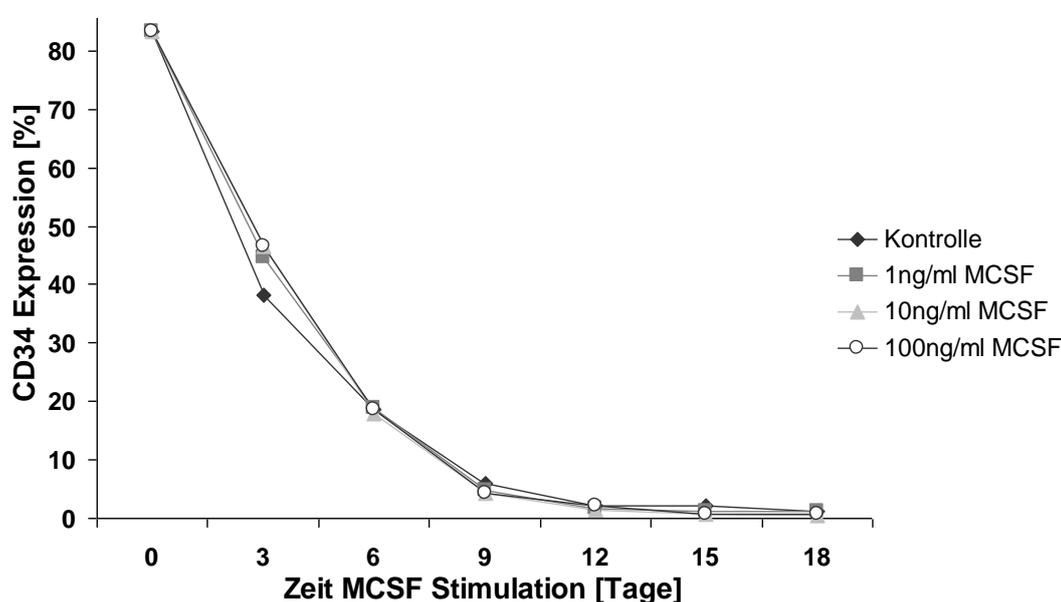


Abbildung 6: Die Expression des CD34 Oberflächenmarkers während der MCSF induzierten myeloiden Differenzierung. Es ist zu erkennen, dass die Expression des CD34 Oberflächenmarkers unabhängig von der MCSF Stimulation stark abnimmt. Der Graph zeigt den Mittelwert der durchflusszytometrischen Untersuchungen von je 3 unabhängigen Experimenten.

Der Oberflächenmarker CD11b ist ein genereller differenzierungsassoziiertes Oberflächenmarker während der Reifung von myeloiden Zellen. Während der Kultivierung der Zellen ist eine Zunahme des CD11b Oberflächenmarkers in allen Konditionen deutlich zu erkennen, was die myeloide Reifung der Zellen belegt. Die Zunahme der CD11b Expression in den MCSF-stimulierten Zellen ist stärker als in

den Kontrollzellen, jedoch zeigen die verschiedenen MCSF-Konzentrationen keinen wesentlichen Einfluss auf die CD11b Expression (Abbildung 7).

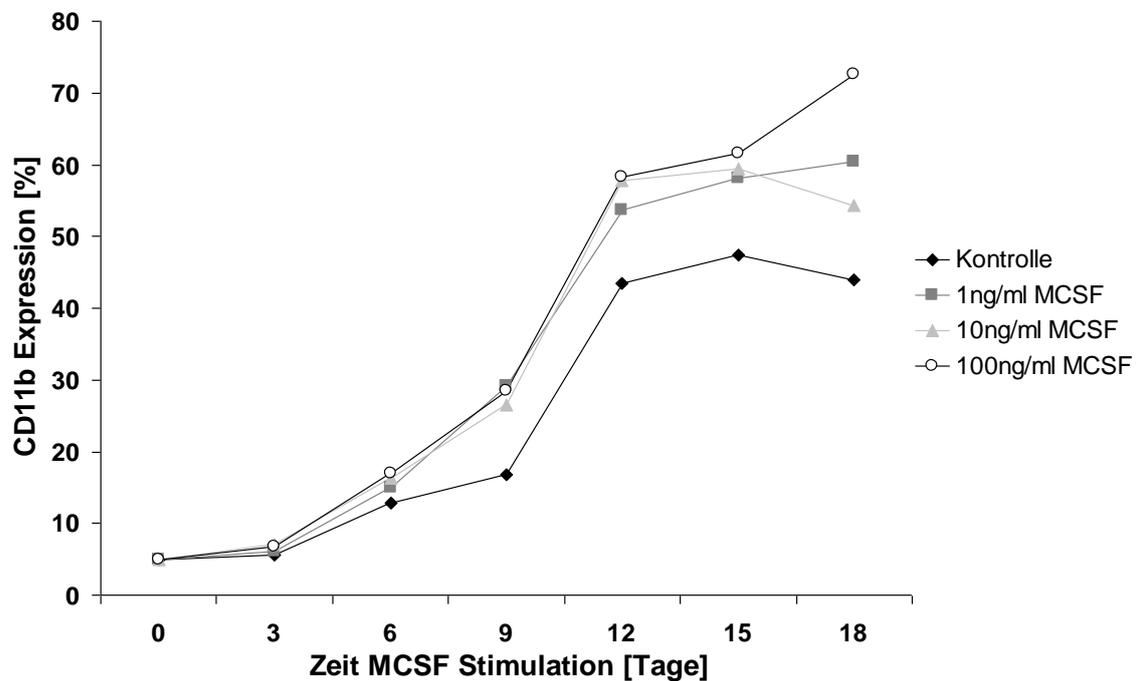


Abbildung 7: Expressionsanalyse des CD11b Oberflächenmarkers während der MCSF induzierten myeloiden Differenzierung. Es ist zu erkennen, dass die Expression des CD11b Oberflächenmarkers durch die MCSF-Stimulation stärker zunimmt als in der Kontrolle. Die Zunahme der CD11b Expression zeigt die myeloide Differenzierung der Zellen an. Der Graph zeigt den Mittelwert der durchflusszytometrischen Untersuchungen von je 3 unabhängigen Experimenten.

Des Weiteren wurde die Expression des monozytären Oberflächenmarkers CD14 untersucht, um die von MCSF stimulierte Reifung von Monozyten nachzuweisen. Hier ist eine verstärkte Zunahme des CD14 Oberflächenmarkers in den MCSF-stimulierten Zellen zu erkennen. Der größte Unterschied in der CD14 Expression, zwischen den MCSF-stimulierten Zellen und den Kontrollzellen, zeigt sich an Tag 12 und 15. Die unterschiedlichen MCSF-Konzentrationen zeigen nur einen leichten Einfluss auf die CD14 Expression (Abbildung 8).

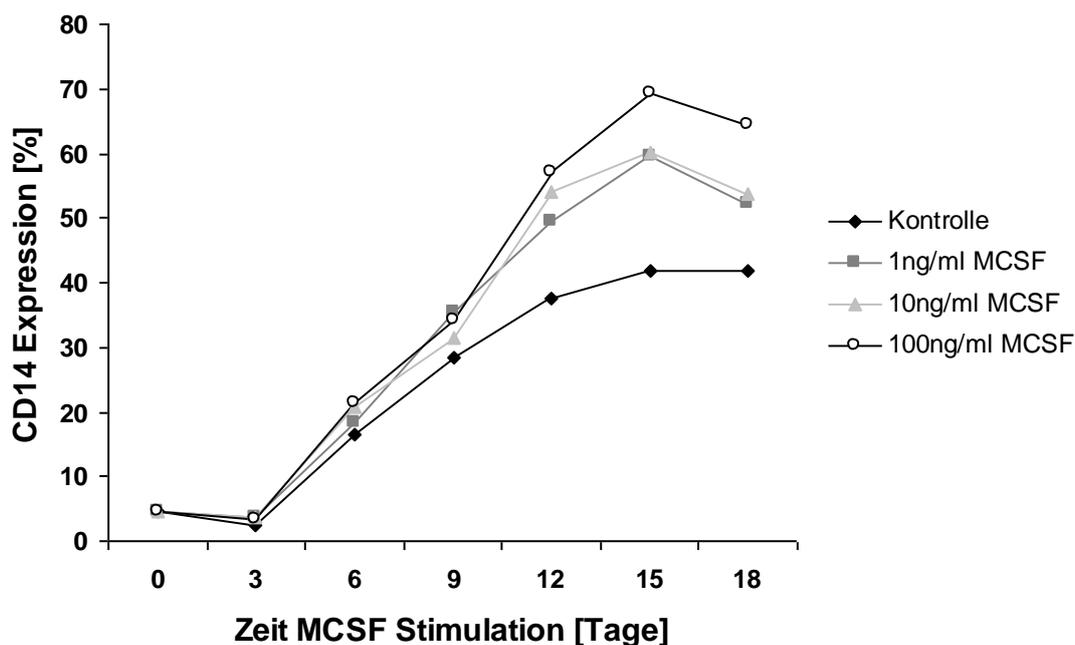


Abbildung 8: Die Expression des CD14 Oberflächenmarkers während der MCSF induzierten myeloiden Differenzierung. Es ist zu erkennen, dass die Expression des CD14 Oberflächenmarkers durch die MCSF-Stimulation stärker zunimmt als in der Kontrolle. Die CD14 Expression zeigt die zunehmende monozytäre Differenzierung an. Der Graph zeigt den Mittelwert der durchflusszytometrischen Untersuchungen von je 3 unabhängigen Experimenten.

Um zu zeigen, dass die MCSF stimulierten Zellen stärker in die monozytäre Linie differenzieren, wurde die Expression des Granulozyten-assoziierten Oberflächenmarkers CD15 untersucht. Hier zeigt sich kein Unterschied in der CD15 Expression zwischen den MCSF stimulierten und den Kontrollzellen (Abbildung 9). Es ist zu erkennen, dass ca. 25 % der Zellen den Oberflächenmarker CD15 tragen, was im Vergleich zu ca. 60 % CD14 positiven Zellen (Abbildung 8) eine verstärkte Reifung der monozytären Linie zeigt.

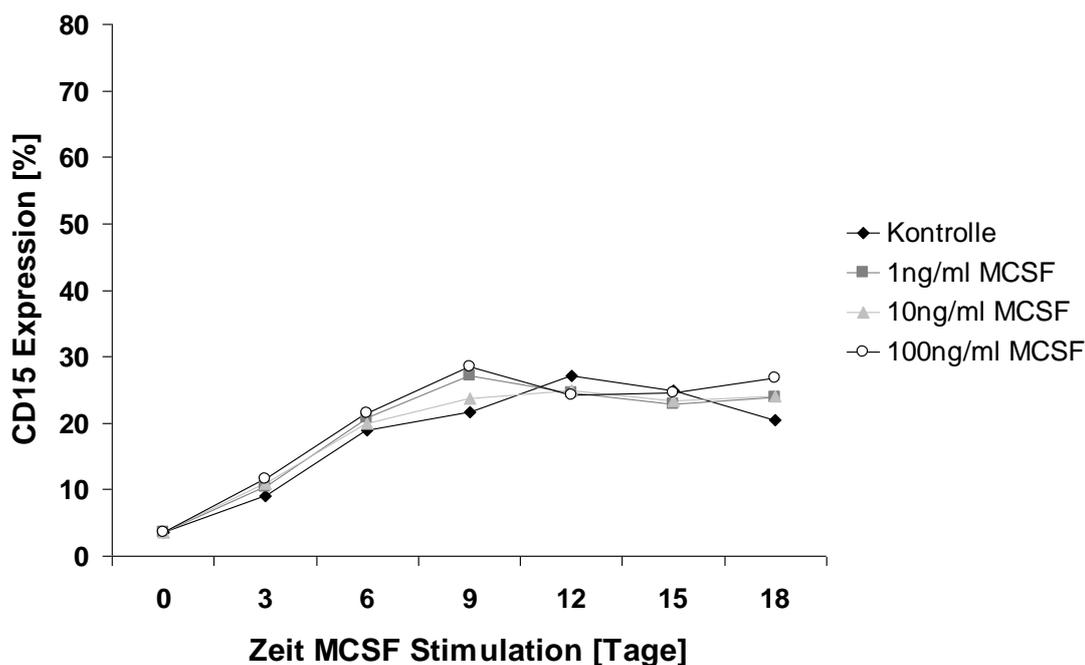


Abbildung 9: Expressionsanalyse des CD15 Oberflächenmarkers während der MCSF induzierten myeloiden Differenzierung. Es ist kein Unterschied in der Expression des CD15 Oberflächenmarkers zwischen MCSF Stimulation und Kontrolle zu erkennen. Die geringe Zunahme der CD15 Expression zeigt die granulozytäre Differenzierung an. Der Graph zeigt den Mittelwert der durchflusszytometrischen Untersuchungen von je 3 unabhängigen Experimenten.

Zur weiteren Kontrolle der myeloiden Differenzierung wurde die morphologische Veränderung der Zellen untersucht. Hierzu wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten auf Objektträger zentrifugiert und mittels Pappenheim-Färbung angefärbt (Abbildung 10). Es ist zu erkennen, dass die undifferenzierten $CD34^+/CD38^+$ Zellen am Tag 0 große Kerne und einen geringen Zytoplasmasaum aufweisen. Die Differenzierung der Zellen erkennt man durch das veränderte Verhältnis zwischen Kern und Zytoplasma und an der Zunahme der Granularität der Zellen. Es ist zu erkennen, dass sowohl die MCSF-stimulierten Zellen als auch die Kontrollzellen zu Monozyten differenzieren. Bei den Kontrollzellen handelt es sich um eine Spontandifferenzierung, bei der wie bereits in den durchflusszytometrischen Untersuchungen (Abbildung 7 und Abbildung 8) gezeigt werden konnte weniger Zellen ausreifen als bei den MCSF-stimulierten Ansätzen.

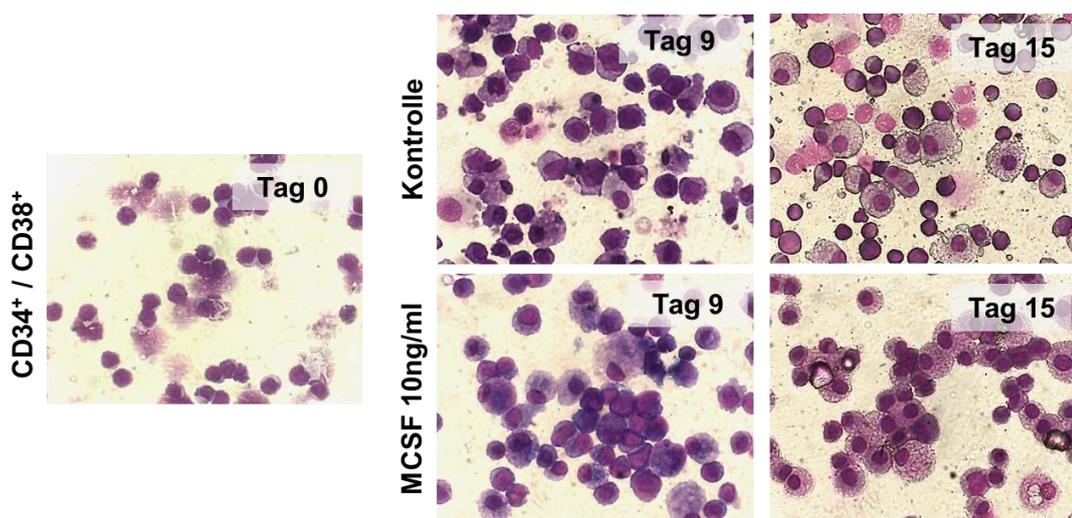


Abbildung 10: Morphologische Untersuchung der myeloiden Differenzierung. Pappenheim-Färbung von CD34 positiven Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0, Tag 9 und Tag 15). Die Zellen wurden ohne (Kontrolle) bzw. mit MCSF (10 ng/ml) kultiviert. Die MCSF stimulierten Zellen zeigen eine größere Anzahl differenzierter Zellen.

3.1.2 MicroRNA Expressionsanalysen in der myeloiden Differenzierung von humanen CD34⁺/CD38⁺ Progenitorzellen

MicroRNAs spielen eine wichtige Rolle in der hämatopoetischen Differenzierung und in der Leukämogenese. Daher wurde das miRNA Expressionsmuster während der MCSF-induzierten myeloiden Differenzierung von humanen CD34⁺/CD38⁺ Progenitorzellen zu Monozyten untersucht. Dazu wurden CD34⁺/CD38⁺ Zellen mittels MACS[®] Separation aus Leukapherisaten isoliert. Für die durchgeführten Experimente wurden immer die isolierten Zellen von 3 unterschiedlichen Leukapherisaten gepoolt, um die Varianzen der miRNAs durch die individuellen Expressionen in den einzelnen Spendern zu reduzieren. Die CD34⁺/CD38⁺ Zellen wurden wie in 3.1.1 erläutert kultiviert und mit 10 ng/ml MCSF zur myeloiden Differenzierung stimuliert bzw. als Kontrolle mit dem Lösungsmittel (H₂O) behandelt. Nach 9 Tagen in Kultur wurde die gesamte RNA der Zellen isoliert. Die aufgereinigte RNA wurde mittels miRCURY LNA[™] microRNA Array Labeling Kit mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 (MCSF stimuliert) und Cy5 (Kontrolle) markiert und anschließend auf einen Exiqon miRCURY LNA[™] microRNA Array hybridisiert. Um eine Varianz der beiden Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und Cy5 zu verringern, wurde das Experiment mit

vertauschten RNA Labeling wiederholt. Die Normalisierung der Array Daten erfolgte über die snRNA U6 (*small nuclear RNA*). Anschließend wurde aus den Expressionswerten der miRNAs das Verhältnis (MCSF/Kontrolle) gebildet. Mittels T-Test wurde die Signifikanz der verschiedenen Expressionswerte zueinander bestimmt. Alle miRNAs die in beiden Wiederholungen gleich reguliert waren (Induktion oder Repression) und die im T-Test einen Wert $p \leq 0,1$ hatten wurden in die weitere Betrachtung einbezogen. So konnten insgesamt 137 miRNAs als unterschiedlich exprimiert identifiziert werden (Abbildung 11). Von den identifizierten miRNAs konnte für 6 miRNAs eine Repression und für 131 miRNAs eine Induktion während der MCSF-induzierten myeloiden Differenzierung von CD34 positiven humanen Vorläuferzellen gezeigt werden.



Abbildung 11: MicroRNA Expressionsprofil während der MCSF induzierten myeloiden Differenzierung von humanen CD34⁺ Progenitorzellen. Die Abbildung zeigt die logarithmische Darstellung der Ratio (MCSF/Kontrolle) der miRNA Expression am Tag 9 der MCSF Stimulation. Dargestellt sind die verrechneten Mittelwerte aus zwei Microarrays ($p \leq 0,1$).

Die Expressionsverhältnisse (MCSF/Kontrolle) der 6 reprimierten und der 20 am stärksten induzierten miRNAs sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3. Top 26 regulierte miRNAs am Tag 9, der MCSF induzierten myeloiden Differenzierung von humanen CD34⁺ Progenitorzellen.

miRNA	Ratio MCSF / Kontrolle	Stabw.
hsa-miR-106a	0,580554701	0,16
hsa-miR-155	0,586898947	0,30
hsa-let-7c	0,613873426	0,11
hsa-let-7i	0,622128606	0,10
hsa-let-7a	0,634776841	0,08
hsa-miR-503	0,76863001	0,06
hsa-miR-197	2,281146508	0,32
hsa-miR-520e	2,283033695	0,03
hsa-miR-520a	2,285517964	0,27
hsa-miR-497	2,324589019	0,05
hsa-miR-302b	2,335689569	1,22
hsa-miR-369-5p	2,382737279	0,22
hsa-miR-369-5p	2,415088445	0,77
hsa-miR-515-5p	2,432221082	0,21
hsa-miR-95	2,439642414	0,41
hsa-miR-448	2,481907354	0,32
hsa-miR-181c	2,504869489	1,12
hsa-miR-518f*-526a	2,506567009	0,88
hsa-miR-374	2,531307175	1,43
hsa-miR-453	2,567725749	0,75
hsa-miR-224	2,577846066	0,82
hsa-miR-492	2,578942847	0,19
hsa-miR-302b*	2,596132108	0,19
hsa-miR-429	2,697883019	0,04
hsa-miR-487b	3,036697443	0,95
hsa-miR-452*	3,435261471	0,91

Bei den miRNA Expressionsanalysen fiel die miR-155 als stark reprimierte miRNA während der MCSF-induzierten myeloiden Differenzierung auf. In verschiedenen Publikationen wurde die miR-155 bereits als onkogene miRNA beschrieben. So

wurde im Mausmodell gezeigt, dass eine Überexpression der miR-155 in hämatopoetischen Stammzellen zu einer myeloproliferativen Erkrankung führt [126]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine hohe miR-155 Expression in AML Patienten mit einer schlechten Prognose assoziiert ist [132]. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf die Rolle der miR-155 in der Leukämogenese bzw. der myeloiden Differenzierung näher untersucht werden.

3.2 Funktionelle und Regulatorische Analyse der miR-155 in der FLT3-ITD assoziierten AML

3.2.1 miR-155 Expression in AML Patienten

In den vorangegangenen miRNA-Microarray-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Expression der miR-155 während der myeloiden Differenzierung stark herunter reguliert wird. Da die miR-155 in verschiedenen Studien bereits als onkogene miRNA beschrieben wurde, stellte sich die Frage, wie die miR-155 in verschiedenen AML-Patientenproben exprimiert wird. Hierzu wurde mittels qRT-PCR die Expression der miR-155 im Knochenmark von 56 AML-Patienten und 3 gesunden Spendern analysiert. Hier konnte gezeigt werden, dass die miR-155 in den AML-Patientenproben höher exprimiert ist, als in den Proben der gesunden Spender (Abbildung 12).

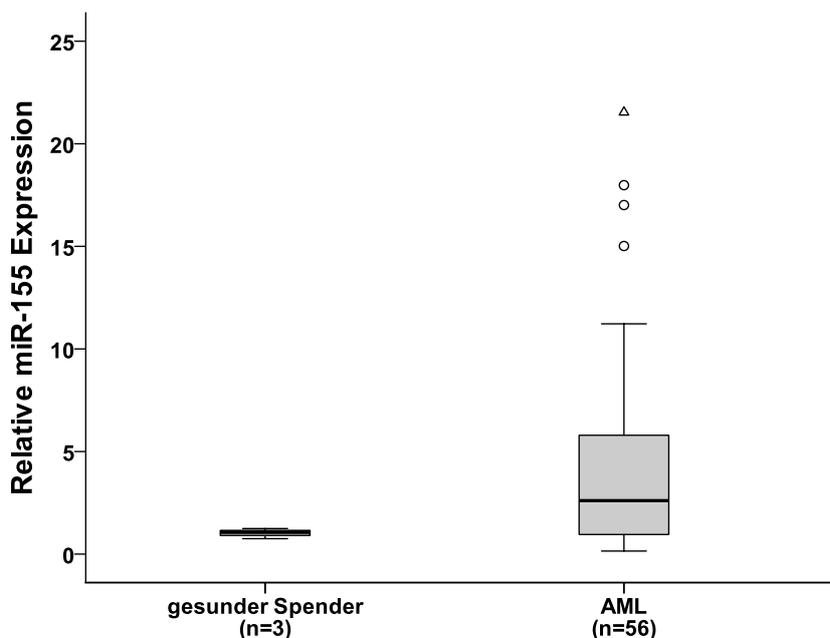


Abbildung 12: Expressionsanalysen der miR-155 in AML-Patientenproben. Die qRT-PCR zeigt eine erhöhte Expression der miR-155 im Knochenmark von AML-Patienten im Vergleich zu Proben von gesunden Spendern. (○ Ausreißer; Δ extreme Ausreißer)

Zur näheren Analyse der miR-155 Expression in der akuten myeloischen Leukämie wurden 25 Patientenproben nach den klinisch prognostischen Mutationen FLT3-ITD, NPM1 Mutation, sowie den klinisch prognostischen

zytogenetischen Abberationen Inversion 16 (inv.16), Translokation (15;17) (t(15;17)) und Translokation (8;21) (t(8;21)) gruppiert und die miR-155 Expression gegen die Proben von 3 gesunden Spendern verglichen. Hier zeigte sich, dass die miR-155 in den AML-Patientenproben mit einer FLT3-ITD Mutation am höchsten exprimiert ist (Abbildung 13)

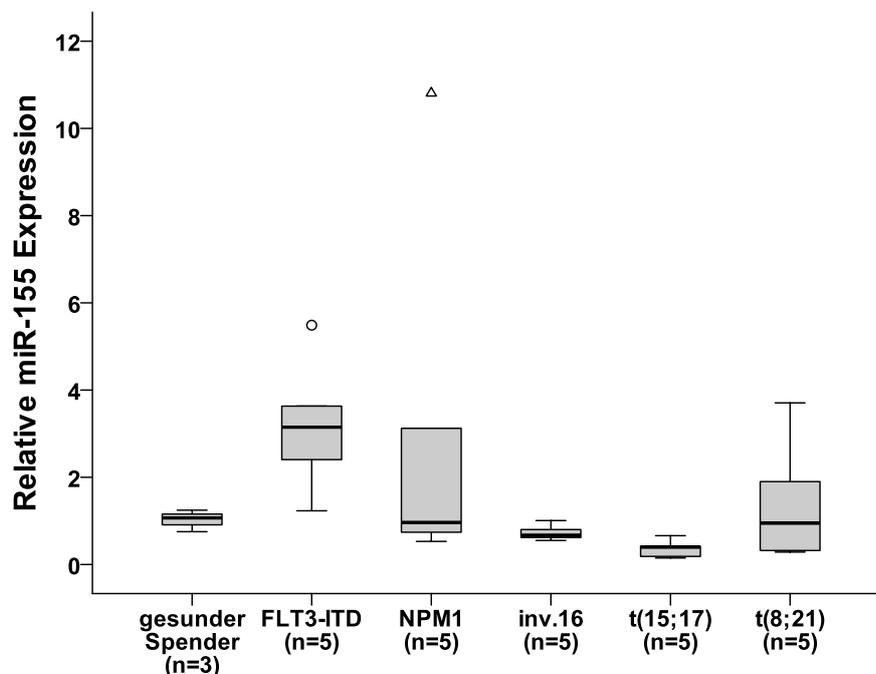


Abbildung 13: Expressionsanalysen der miR-155 in Patientenproben in Abhängigkeit von verschiedenen prognostischen Faktoren. Die qRT-PCR zeigt die Expression der miR-155 im Knochenmark von AML-Patienten sortiert nach verschiedenen Prognostischen Faktoren (FLT3-ITD, NPM1 Mutation, Inversion 16, Translokation t(15;17) und Translokation t(8;21)) im Vergleich zu Proben von gesunden Spendern. Es ist zu erkennen, dass die miR-155 in den FLT3-ITD assoziierten Proben am höchsten exprimiert ist. (○ Ausreißer; △ extreme Ausreißer)

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass die miR-155 in FLT3-ITD assoziierten AML-Patientenproben am höchsten exprimiert ist, daher wurde weiterführend untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen dem FLT3-Status und der miR-155 Expression gibt. Hierzu wurden 56 AML-Patientenproben nach ihrem FLT3-Status in folgende Gruppen unterteilt: FLT3-WT, FLT3-TKD, FLT3-ITD/TKD, FLT3-ITD sowie 3 Proben von gesunden Spendern und die miR-155 Expression verglichen (Abbildung 14). Die Ergebnisse zeigen, dass die miR-

155 in AML-Proben mit FLT3-ITD Mutation signifikant höher exprimiert ist als in AML-Patientenproben mit Wildtyp FLT3, FLT3-TKD Mutationen oder Proben von gesunden Spendern. Der Vergleich der miR-155 Expression zwischen den Proben mit FLT3-ITD Mutation oder den Proben mit einer Doppelmutation FLT3-ITD/TKD zeigt ebenfalls eine erhöhte Expression der miR-155 in den FLT3-ITD assoziierten Proben, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant.

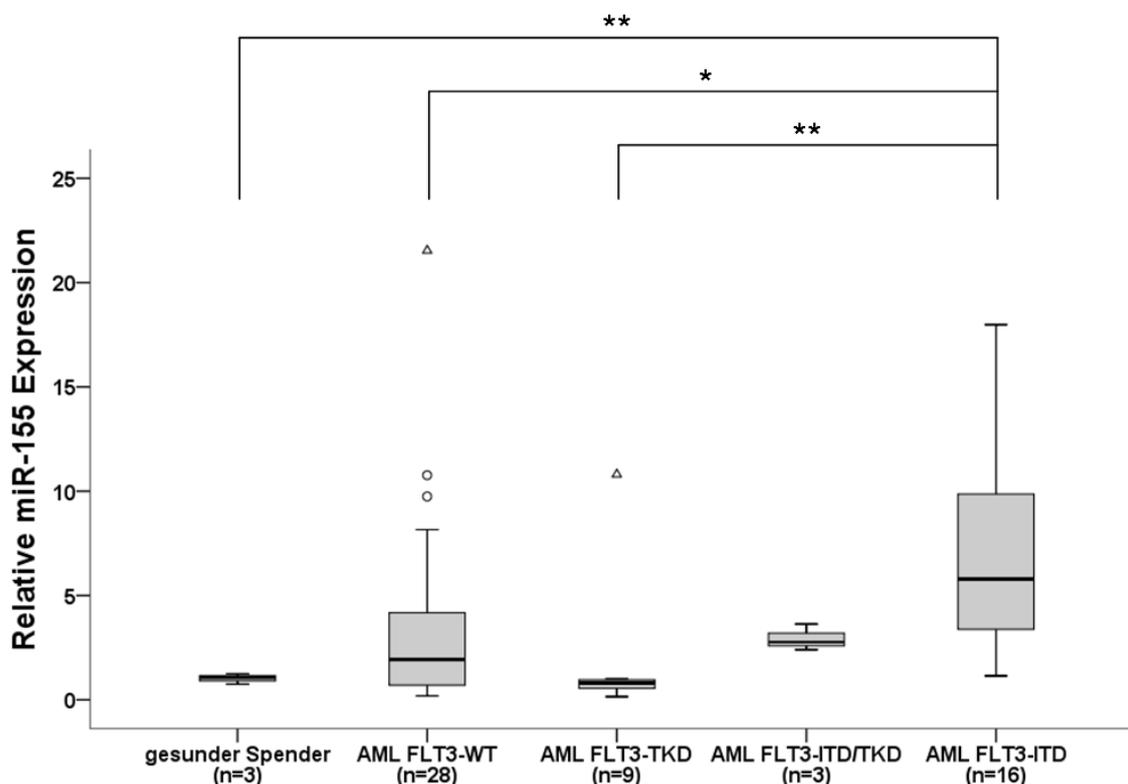


Abbildung 14: Expressionsanalyse der miR-155 in Patientenproben mit unterschiedlichem FLT3-Status. qRT-PCR der miR-155 Expression im Knochenmark von 3 gesunden Spendern and 56 AML-Patienten sortiert nach ihrem FLT3-Status (FLT3-WT (n = 28), FLT3-TKD (n = 9), FLT3-ITD/TKD (n = 3) und FLT3-ITD (n = 16)). Die miR-155 Expression ist signifikant erhöht in Patienten mit FLT3-ITD Mutationen.

3.2.2 Die Überexpression von FLT3-ITD induziert die miR-155 Expression

In verschiedenen Arbeiten sowie in den vorangegangenen Ergebnissen konnte eine Korrelation zwischen der miR-155 Expression und dem Auftreten einer FLT3-ITD Mutation bei AML-Patienten gezeigt werden[127-130]. Um zu untersuchen ob die FLT3-ITD Mutation zur Induktion der miR-155 führt, wurden verschiedene

FLT3-Konstrukte (FLT3-WT, FLT3-TKD, FLT3-ITD) in U937 Zellen transfiziert. Nach 24 h wurde die RNA der Zellen isoliert und die Expression der miR-155 mittels qRT-PCR gemessen und mittels $2^{\Delta\Delta Ct}$ Methode berechnet. Zur Normalisierung wurde die small nuclear RNA U6 (RNU6B) verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass die miR-155 in den FLT3-ITD transfizierten Zellen 2,2 Fach höher exprimiert wurde als in den FLT3-WT exprimierenden Zellen (Abbildung 15). Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Überexpression von FLT3-TKD zu einer Reduktion der miR-155 Expression führt (Abbildung 15).

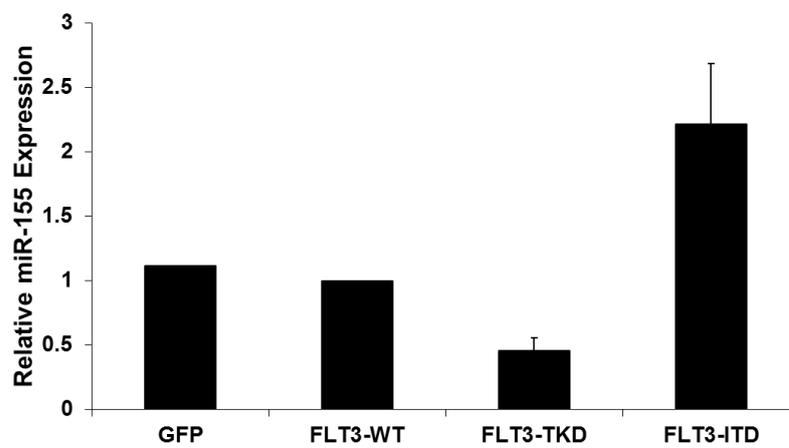


Abbildung 15: Die Überexpression von FLT3-ITD induziert die miR-155 Expression. Die qRT-PCR zeigt die Expression der miR-155 in U937 Zellen nach Überexpression von GFP, FLT3-WT, FLT3-TKD und FLT3-ITD. Die Expression der miR-155 wird durch die Überexpression von FLT3-ITD erhöht, während FLT3-TKD zur Reduktion der miR-155 Expression führt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung.

Zur weiteren Analyse der FLT3-ITD Abhängigkeit der miR-155 Expression wurden murine 32D Zellen untersucht, die ein humanes FLT3-WT ($32D^{FLT3-WT}$) bzw. FLT3-ITD ($32D^{FLT3-ITD}$) stabil exprimieren[54]. Da für das Wachstum der $32D^{FLT3-WT}$ Zellen IL-3 notwendig ist, die $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen jedoch IL-3 unabhängig wachsen, wurden die Zellen für 24 h sowohl in IL-3 konditionierten Medium als auch ohne IL-3 kultiviert. Mittels qRT-PCR wurde die Expression der miR-155 bestimmt. Es ist zu erkennen, dass die Expression der miR-155 in den $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen, unabhängig von IL-3, 10-fach höher ist als in den $32D^{FLT3-WT}$ Zellen (Abbildung 16). Zwar führt die IL-3 Versorgung der Zellen zu einer ca. 5-fach erhöhten miR-155

Expression, der Expressionsunterschied zwischen den beiden Zelllinien $32D^{FLT3-WT}$ und $32D^{FLT3-ITD}$ bleibt jedoch bestehen. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass eine FLT3-ITD Mutation mit einer erhöhten miR-155 Expression korreliert.

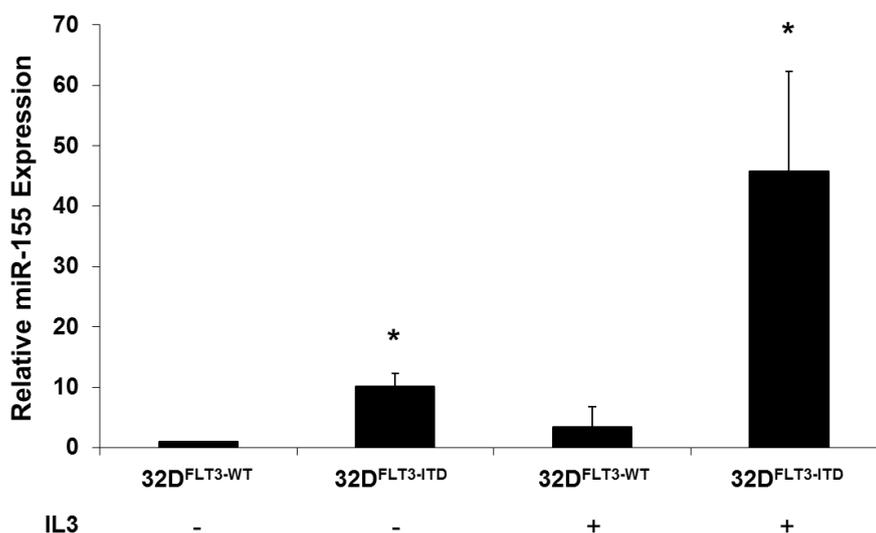


Abbildung 16: FLT3-ITD induziert die miR-155 Expression. Die Expression der miR-155 ist in stabil FLT3-ITD exprimierenden $32D$ Zellen signifikant höher als in $32D^{FLT3-WT}$ Zellen. Die Induktion durch IL-3 zeigt ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression der miR-155 in $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. (* $p \leq 0,05$)

3.2.3 Der Block der FLT3-ITD Tyrosinkinaseaktivität reduziert die miR-155 Expression

Um die Abhängigkeit der miR-155 Expression von FLT3-ITD induzierten Signalwegen näher zu untersuchen, sollte die Tyrosinkinaseaktivität von FLT3-ITD mittels Proteinkinase Inhibitoren (PKIs) geblockt werden. PKC412 [67], SU5614 [68-69] und CEP701 [70] wurden bereits in verschiedenen Publikationen als potente PKIs für die FLT3-ITD Tyrosinkinaseaktivität beschrieben. Die Experimente wurden mit der humanen Zelllinie MV4;11 durchgeführt, welche ein oft verwendetes Zelllinienmodell für eine FLT3-ITD assoziierte AML darstellt.

1×10^6 MV4;11 Zellen wurden für 24 h mit 100 nM PKC412, 1000 nM SU5614 oder 1000 nM CEP701 behandelt. Als Kontrolle wurde DMSO genutzt. STAT5 wird über FLT3-ITD induzierte Signalwege konstitutiv phosphoryliert [54-56], daher wurde mittels Western Blot für phosphoryliertes STAT5 (pSTAT5) der Block der

FLT3-ITD Tyrosinkinaseaktivität überprüft. Nach Behandlung der MV4;11 Zellen mit den verschiedenen PKIs konnte kein pSTAT5 mehr nachgewiesen werden (Abbildung 17A). Die Analyse der miR-155 Expression in den PKI behandelten MV4;11 Zellen zeigte eine Reduktion um ca. 80 % der miR-155 Expression nach Block der FLT3-ITD Tyrosinkinaseaktivität (Abbildung 17B).

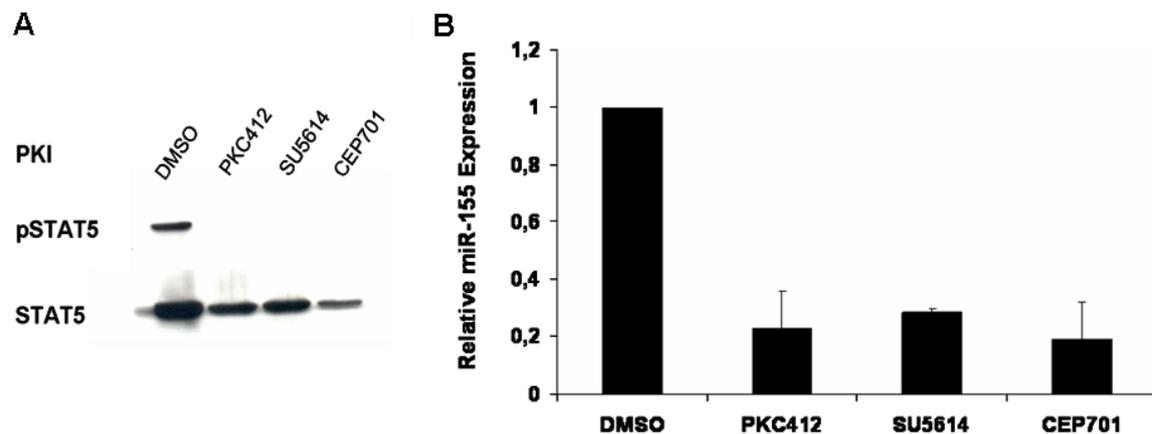


Abbildung 17: Der Block der FLT3-ITD Tyrosinkinaseaktivität inhibiert die miR-155 Expression. MV4;11 Zellen wurden für 24 h mit den Proteinkinaseinhibitoren (PKI) PKC412 (100 nM), SU5614 (1 μ M) und CEP701 (100 nM) behandelt. (A) Der Western Blot zeigt den Block der STAT5 Phosphorylierung nach Inhibition der FLT3-ITD Kinaseaktivität. (B) Die Expression der miR-155 in MV4;11 Zellen ist nach PKI Behandlung um ca. 80 % reduziert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung.

3.2.4 Der Block von STAT5 führt zur Reduktion der miR-155 Expression

Es ist bekannt, dass die FLT3-ITD zu einer starken konstitutiven Aktivierung von STAT5 führt, während FLT3-WT und FLT3-TKD die STAT5 Phosphorylierung nur gering induziert [50, 54, 57]. Da die Überexpression von FLT3-ITD zur Induktion der miR-155 führt, die Überexpression von FLT3-WT bzw. FLT3-TKD jedoch nicht (Abbildung 15), wurde die Hypothese aufgestellt, dass STAT5 eine wichtige Rolle in der Regulation der miR-155 spielt. Um dies zu untersuchen wurden MV4;11 Zellen für 24 h mit 50 μ M STAT5 Inhibitor (*N*-((4-Oxo-4*H*-chromen-3-yl)methylen)nikotinohydrazid) behandelt. Der STAT5 Inhibitor blockiert die Protein-Proteininteraktion von STAT5, indem es die SH2 –Domäne (*Src*-homology 2) von STAT5 inhibiert. Dadurch kann STAT5 nicht mehr phosphoryliert bzw. aktiviert werden. Mittels qRT-PCR wurde die Expression der miR-155 in den behandelten

Zellen gemessen. Hier konnte eine um 80 % reduzierte miR-155 Expression in den STAT5 Inhibitor behandelten Zellen gezeigt werden (Abbildung 18).

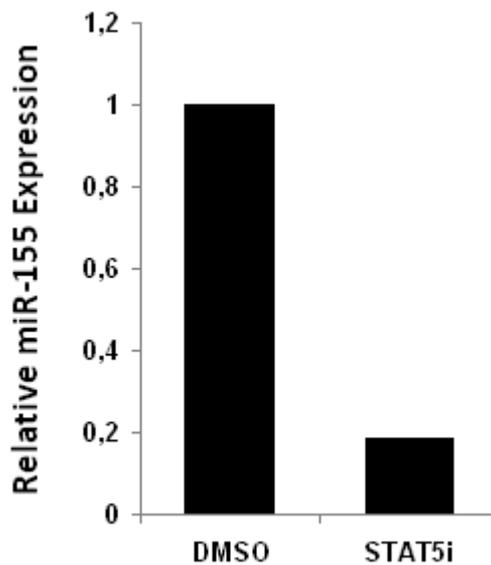


Abbildung 18: Die Inhibition von STAT5 reduziert die Expression der miR-155. MV4;11 Zellen wurden für 24 h mit einem STAT5 Inhibitor behandelt. Die Expression der miR-155 wurde durch den Block von STAT5 um 80 % reduziert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus 2 unabhängigen Experimenten.

Zur weiteren Untersuchung der Rolle von STAT5 in der miR-155 Regulation wurde in MV4;11 Zellen die STAT5 Expression mittels spezifischer siRNA geblockt. Dazu wurden MV4;11 transient mit 1 μ g STAT5-siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 24h in Kultur wurden Proteine und RNA aus den Zellen isoliert. Mittels Western Blot wurde der siRNA-vermittelte *Knockdown* von STAT5 überprüft. Hier konnte eine Reduktion des STAT5 Proteinlevels um ca. 60 % gezeigt werden (Abbildung 19A). Die Expression der miR-155 wurde durch qRT-PCR analysiert. Hier konnte eine Reduktion der miR-155 Expression um ca. 60 % nach STAT5 *Knockdown* nachgewiesen werden (Abbildung 19B).

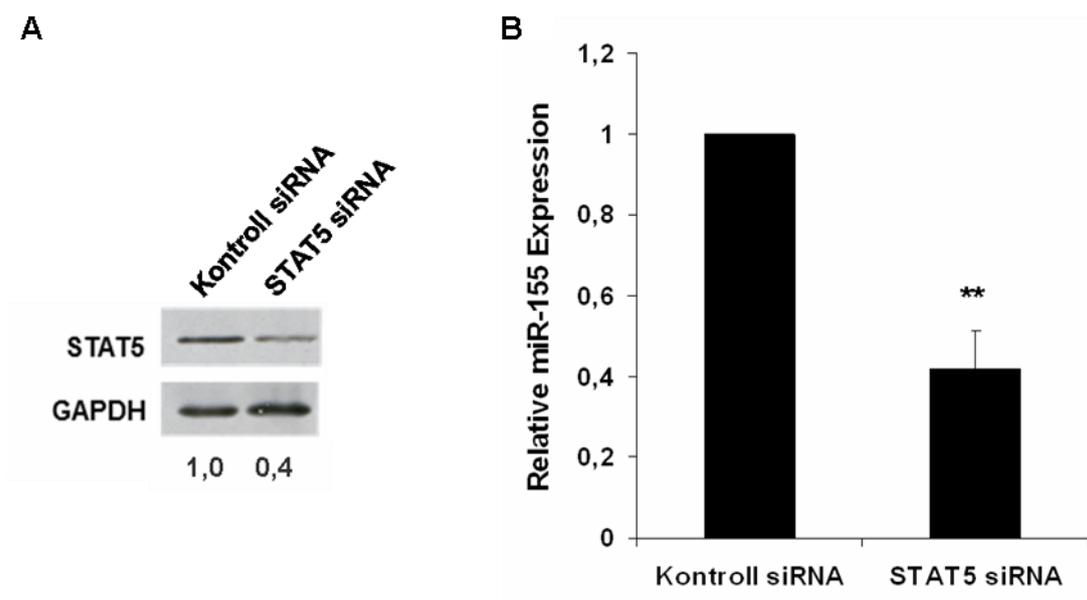


Abbildung 19: Der siRNA-vermittelte *Knockdown* von STAT5 verringert die miR-155 Expression. (A) Der Western Blot zeigt exemplarisch die Reduktion des STAT5 Protein 24 h nach STAT5 siRNA transfektion in MV4;11 Zellen. (B) Die Expression der miR-155 ist nach siRNA-vermittelten STAT5 Block reduziert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. (** $p \leq 0.01$)

Die vorhergehenden Daten zeigen, dass der Block von STAT5 zur Reduktion der FLT3-ITD induzierten miR-155 Expression führt. Um den Einfluss von STAT5 auf die FLT3-ITD induzierte miR-155 Expression *in vivo* zu untersuchen, wurden Knochenmarkproben von transgenen FLT3-ITD Mäusen mit STAT5 *Knockout* (STAT5^{-/-}) bzw. ohne STAT5 *Knockout* (STAT5^{flox/flox}) analysiert. Die Mäuse wurden von Dr. Rebekka Dechow aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Justus Duyster an der Technischen Universität München / Klinikum Rechts der Isar etabliert. Dazu wurde das Knochenmark von Mx1-cre STAT5^{flox/flox} bzw. Kontroll-STAT5^{flox/flox} BALB/c Mäusen isoliert und mittels retroviraler Transduktion mit FLT3-ITD infiziert. Die infizierten Zellen wurden anschließend in letal bestrahlte BALB/c Mäuse transplantiert. Zur Induktion des Mx1-cre vermittelten STAT5 *Knockouts*, wurde den Mäusen 250 μ g HMW polyinosinic:polycytidylic acid (pipC), an Tag 11, 14, 18 und 21 nach der Transplantation, intraperitoneal injiziert. Der vollständige STAT5 *Knockout* konnte am Tag 22 nach der Transplantation beobachtet werden. Durch Injektion von pipC wurde der Promotor der Mx1-cre

Rekombinase und somit der STAT5 *Knockout* induziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der miR-155 in den FLT3-ITD STAT5^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den FLT3-ITD STAT5^{flox/flox} Mäusen signifikant um 60 % reduziert ist (Abbildung 20)

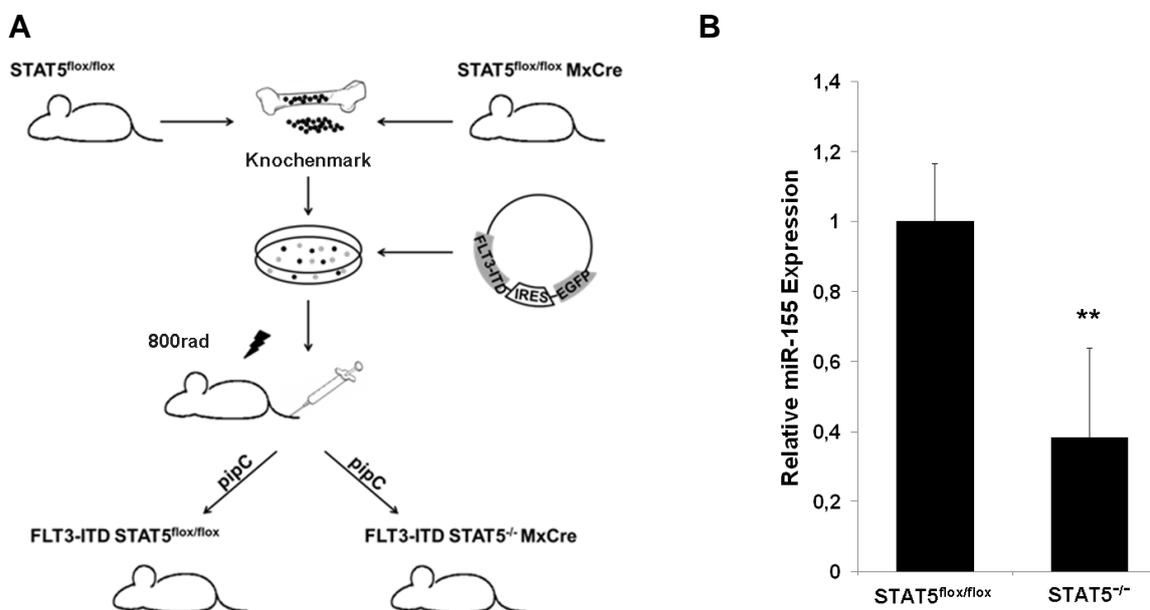


Abbildung 20: Der *Knockout* von STAT5 im FLT3-ITD AML Mausmodell führt zur Reduktion der miR-155 Expression. (A) Schematische Übersicht zur Etablierung des FLT3-ITD AML Mausmodell mit Mx1-cre induzierbaren STAT5 *Knockout*. (B) Die Expressionsanalysen der miR-155 im Knochenmark von FLT3-ITD AML Mäusen zeigen eine hochsignifikante Reduktion in den STAT5 *Knockout* Mäusen (STAT5^{-/-}) (** p < 0,01)

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass STAT5 ein wichtiger Faktor in der FLT3-ITD induzierten miR-155 Expression ist.

3.2.5 Der Block von NF-κB (p65) führt zur Reduktion der miR-155 Expression

In verschiedenen Publikationen wurde bereits gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor NF-κB (p65) die miR-155 Expression in der inflammatorischen Antwort induziert [105, 119]. Weiterhin wurde gezeigt, dass NF-κB durch FLT3

Signalwege [53, 58] angeschaltet wird und in AML Blasten aktiv ist [53, 142-143]. Um die Frage zu beantworten, ob p65 in der FLT3-ITD induzierten miR-155 Expression eine Rolle spielt, wurde die miR-155 in MV4;11 Zellen nach siRNA-vermitteltem p65 *Knockdown* analysiert. Hierzu wurden MV4;11 Zellen mit p65 spezifischer siRNA bzw. Kontroll-siRNA transient transfiziert. Nach 24 h wurden Proteine und RNA aus den Zellen isoliert. Der siRNA-vermittelte p65 *Knockdown* wurde durch Western Blot überprüft. Hier konnte eine Reduktion der p65 Proteinmenge um 60 % nach siRNA Transfektion gezeigt werden (Abbildung 21A). Mittels qRT-PCR wurde gezeigt, dass die miR-155 Expression nach p65 *Knockdown* um ca. 30 % reduziert war (Abbildung 21B).

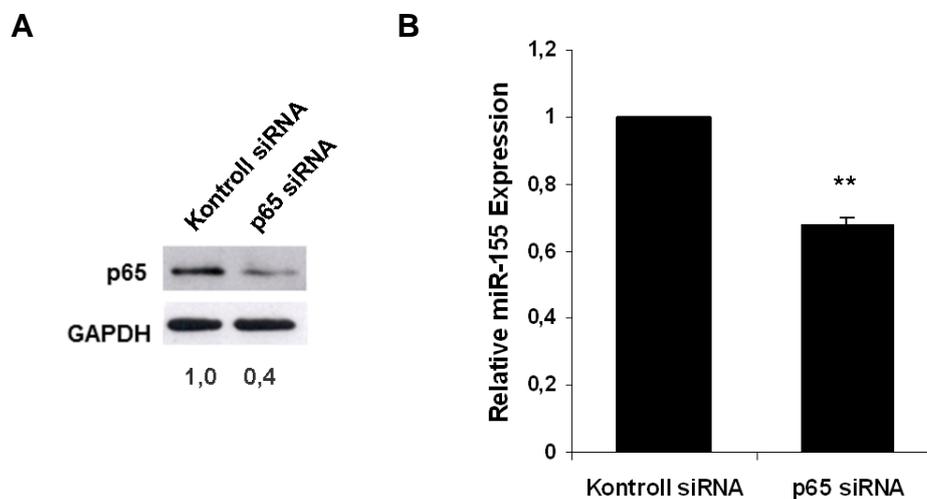


Abbildung 21: Der siRNA vermittelte *Knockdown* von NF-κB (p65) führt zur Reduktion der miR-155 Expression. (A) Der Western Blot zeigt den siRNA vermittelten *Knockdown* von NF-κB (p65) in MV4;11 Zellen. (B) Der *Knockdown* von NF-κB führt zur Reduktion der miR-155 in MV4;11 Zellen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung. (** p ≤ 0,01)

In den vorhergehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass STAT5 und p65 eine wichtige Rolle in der FLT3-ITD induzierten miR-155 Expression spielen. Um dieses regulatorische Netzwerk weiter zu untersuchen, sollte gezeigt werden, ob der *Knockdown* von p65 und STAT5 die Induktion der miR-155 Expression nach FLT3-ITD Überexpression in U937 Zellen verhindern kann. Hierzu wurden U937 mit FLT3-ITD und verschiedenen siRNAs (Kontroll siRNA, p65 siRNA,

STAT5 siRNA und STAT5 / p65 siRNA) co-transfiziert. Nach 24 h wurde die RNA der Zellen isoliert und die Expression der miR-155 mittels qRT-PCR gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der *Knockdown* von p65 oder STAT5 zu einer reduzierten Induktion der miR-155 Expression führt. Der stärkste Effekt konnte für den *Co-Knockdown* von p65 und STAT5 gezeigt werden. Hier wurde die Induktion der miR-155 Expression um 80 % reduziert (Abbildung 22).

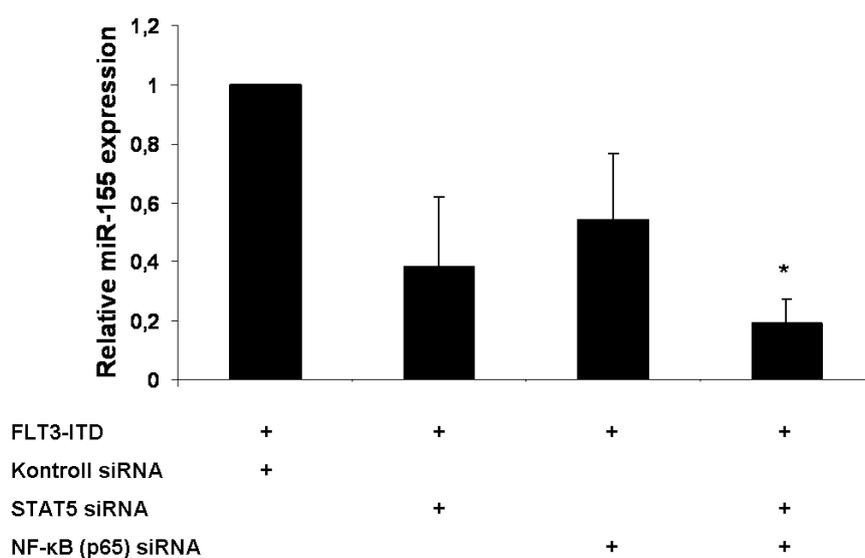


Abbildung 22: Der *Knockdown* von STAT5 und NF-κB verringern die FLT3-ITD vermittelte miR-155 Induktion. U937 Zellen wurden mit FLT3-ITD und verschiedenen siRNAs (Kontrolle, STAT5, NF-κB (p65) sowie Kombination von STAT5 und NF-κB (p65) siRNA) co-transfiziert. Nach 24 h wurde die miR-155 Expression mittels qRT-PCR analysiert. Der siRNA vermittelte Block der FLT3-ITD induzierten Signalwege von STAT5 und NF-κB führt zu einer geringeren Induktion der miR-155 Expression. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung. (* $p \leq 0,05$)

3.2.6 NF-κB (p65) bindet direkt am miR-155 Promotor

Bei *in silico* Analysen im 5' *upstream* Bereich des miR-155 Locus konnten zwei potenzielle Bindestellen für p65 sowie eine putative STAT Bindestelle gefunden werden (Abbildung 23).



Abbildung 23: Schematische Übersicht der miR-155 Promotorregion.

Gatto et al. haben bereits gezeigt, dass p65 die miR-155 während der Epstein-Barr Virus Infektion durch direkte Promotorbindung induziert [105]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass beim kutanen T-Zell Lymphom STAT5 im Promotorbereich der miR-155 bindet und so deren Expression induziert [108]. Um die transkriptionelle Regulation der miR-155 weiter zu analysieren, wurde mittels Promotor-Luziferase Assay die Aktivierung des miR-155 Promotors in MV4;11 Zellen untersucht. Dazu wurden 3 Promotor-Luziferasekonstrukte mit unterschiedlich langen miR-155 Promotorbereichen genutzt (pGL3-1065, pGL3-1380 und pGL3-1783) bzw. als Kontrolle ohne miR-155 Promotor (pGL3) (Abbildung 24).

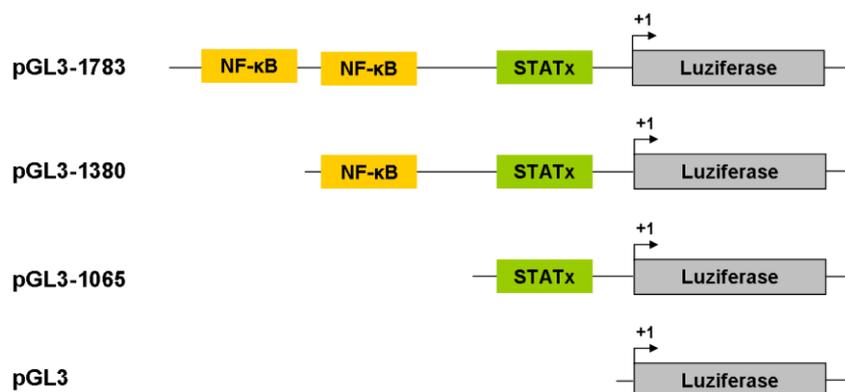


Abbildung 24: Schematische Übersicht der miR-155 Promotor Luziferase Konstrukte.

Zur Analyse der miR-155 Promotoraktivierung wurden 1×10^6 MV4;11 Zellen mittels Lipofektion mit einem Firefly Luziferasekonstrukt (pGL3, pGL3-1783, pGL3-1380 oder pGL3-1065) und mit einem Renilla Luziferasekonstrukt transient transfiziert. Nach 24 h wurde die Luziferaseaktivität mittels DUAL Luziferaseassay (Promega) gemessen. Die gemessenen Werte der Firefly Luziferase wurden durch Division mit den Renilla Luziferase Werten normalisiert. Es ist zu erkennen, dass die Aktivierung des miR-155 Promotors mit der Länge des klonierten Promotorbereiches zunimmt (Abbildung 25).

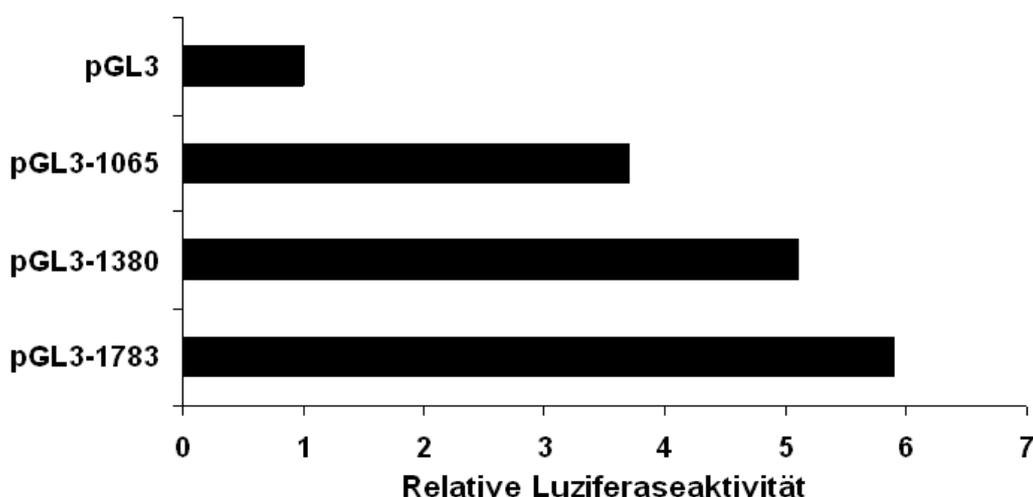


Abbildung 25: Luziferaseassay zur Bestimmung der Promotoraktivität des miR-155 Promotor in MV4;11 Zellen. Die Promotoraktivität nimmt mit dem Verlust der NF- κ B Bindestellen ab (pGL3-1380 und pGL3-1065). Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus 2 unabhängigen Experimenten.

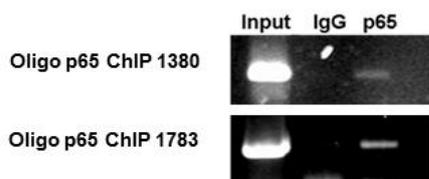
Mittels Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) wurde untersucht, ob p65 und STAT5 auch in der FLT3-ITD assoziierten AML durch direkte Promotorinteraktion die miR-155 reguliert. In MV4;11 Zellen konnte für beide putativen Bindestellen (Abbildung 26A) gezeigt werden, dass p65 am miR-155 Promotor gebunden ist (Abbildung 26B). Für STAT5 konnte in MV4;11 Zellen keine Bindung am miR-155 Promotor nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Da bereits bekannt ist, dass NF- κ B durch den FLT3-ITD induzierten PI3K/Akt Signalweg aktiviert wird [59-60, 144], wurde untersucht ob die p65 Bindung am miR-155 Promotor FLT3-ITD abhängig erfolgt. Dazu wurden MV4;11 Zellen mit dem PKI CEP701 (100 nM)

oder mit DMSO (Kontrolle) behandelt. Nach 24 h wurde eine ChIP Analyse für p65 durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass nach der Inhibierung des FLT3-ITD Signalweges keine Bindung von p65 am miR-155 Promotor nachgewiesen werden konnte (Abbildung 26C). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die p65 Bindung am miR-155 Promotor FLT3-ITD abhängig ist.

A



B



C

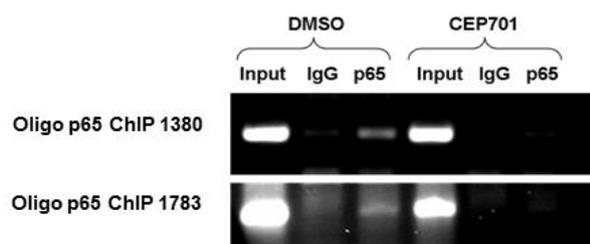


Abbildung 26: NF-κB (p65) bindet FLT3-ITD abhängig am miR-155 Promotor. (A) Schematische Darstellung des miR-155 Promotors mit Lage der Oligos zur Amplifikation der aufgereinigten DNA. (B) Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) für NF-κB (p65) in MV4;11 Zellen. NF-κB (p65) bindet an beide vorhergesagte NF-κB Bindestellen. (C) Nach Block der FLT3-ITD Kinaseaktivität durch den Proteinkinaseinhibitor CEP701 in MV4;11 Zellen bindet NF-κB nicht mehr am miR-155 Promotor.

3.2.7 Konstitutiv aktives STAT5 verstärkt die NF-κB (p65) induzierte miR-155 Promotoraktivität

Um den Einfluss von p65 und STAT5 auf die miR-155 Promotoraktivität weiter zu untersuchen, wurden Promotor-Luziferaseassays durchgeführt. Hierzu wurden 293T Zellen mit einem miR-155 Promotor Luziferasekonstrukt (pGL3-1783) oder einem Kontroll Luziferasekonstrukt (pGL3) transfiziert. Zusätzlich wurden p65, STAT5 oder konstitutiv aktives STAT5 (STAT5 1*6) in den Zellen überexprimiert.

Als Kontrolle diente der Leervektor pcDNA3.1. Nach 24 h wurde die Luziferaseaktivität der Zellen gemessen. Hier konnte gezeigt werden, dass p65 die Aktivierung des miR-155 Promotors im Vergleich zur Kontrolle ca. 10-fach erhöht. Im Gegensatz dazu, führte die Überexpression von STAT5, oder von konstitutiv aktivierten STAT5 (STAT5 1*6) nicht zu einer Aktivierung des miR-155 Promotors. Die Co-Expression von p65 und STAT5 1*6 zeigte im Vergleich zur Einzeltransfektion mit p65, sowie zur Co-Expression von p65 und STAT5 eine zusätzliche Verstärkung der miR-155 Promotoraktivität (Abbildung 27). Zusammenfassend lässt sich aus den Daten schließen, dass p65 durch direkte Promotorbindung zur Aktivierung der miR-155 Expression führt. Konstitutiv aktives STAT5 verstärkt die p65 abhängige miR-155 Induktion.

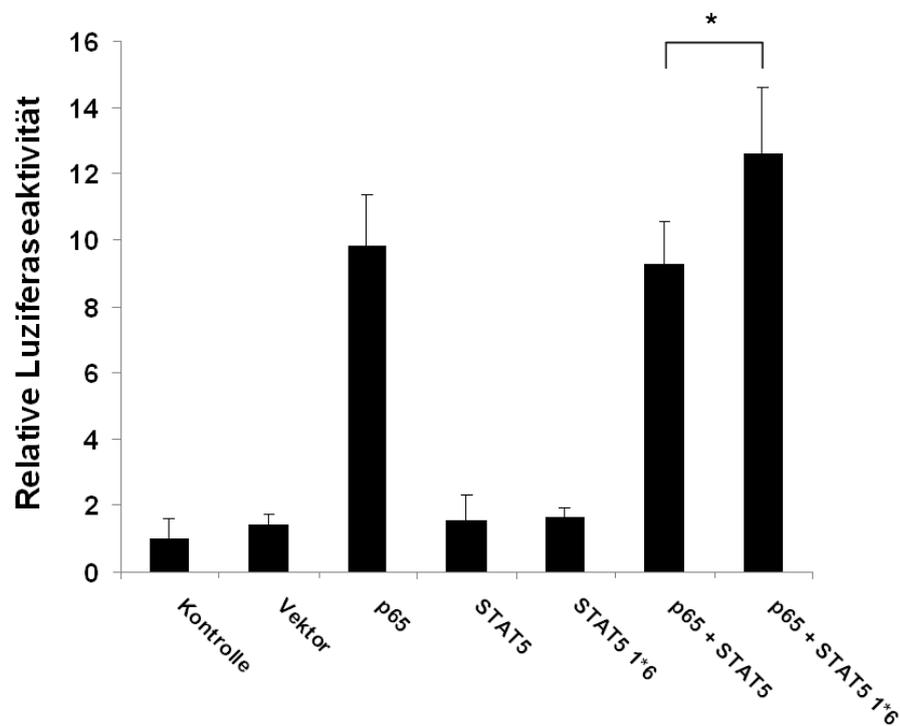


Abbildung 27: NF- κ B (p65) und STAT5 1*6 induzieren die miR-155 Promotoraktivität. 293T Zellen wurden transient mit dem miR-155 Promotor Luziferase Konstrukt (pGL3-1783) oder der Kontrolle (pGL3) und dem Leervektor, p65, STAT5 und konstitutiv aktiven STAT5 co-transfiziert. Nach 24 h wurde die Luziferaseaktivität gemessen. Es ist zu erkennen, dass die Promotoraktivität primär durch NF- κ B (p65) induziert wird. Die Co-Expression von NF- κ B und konstitutiv aktiven STAT5 führt zu einer zusätzlichen Erhöhung der miR-155 Promotoraktivität. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Alle Werte wurden zur Renilla Luziferase normalisiert und zur pGL3 Aktivität berechnet (* $p \leq 0,05$).

3.2.8 Die Reduktion der miR-155 Expression ist wichtig für die myeloide Differenzierung

O'Connell et al. konnten *in vivo* bereits zeigen, dass die erhöhte Expression der miR-155 in murinen hämatopoetischen Stammzellen zu einer myeloproliferativen Erkrankung führt [126]. Um die Funktion der miR-155 während der Hämatopoese bzw. in der Leukämogenese besser zu verstehen, wurde die Expression der miR-155 in verschiedenen Zell-Subpopulationen aus murinen Knochenmark untersucht. Die zu untersuchenden Knochenmark-Subpopulationen LSK, CMP, GMP, MEP und Granulozyten wurden mittels Durchflusszytometer sortiert. Anschließend wurde die RNA isoliert und mittels qRT-PCR die Expression der miR-155 Expression gemessen. Es ist zu erkennen, dass die miR-155 in den undifferenzierteren Knochenmark-Subpopulationen (LSK und CMP) am höchsten expremiert ist und mit zunehmender Reifung der Zellen in ihrer Expression abnimmt (Abbildung 28).

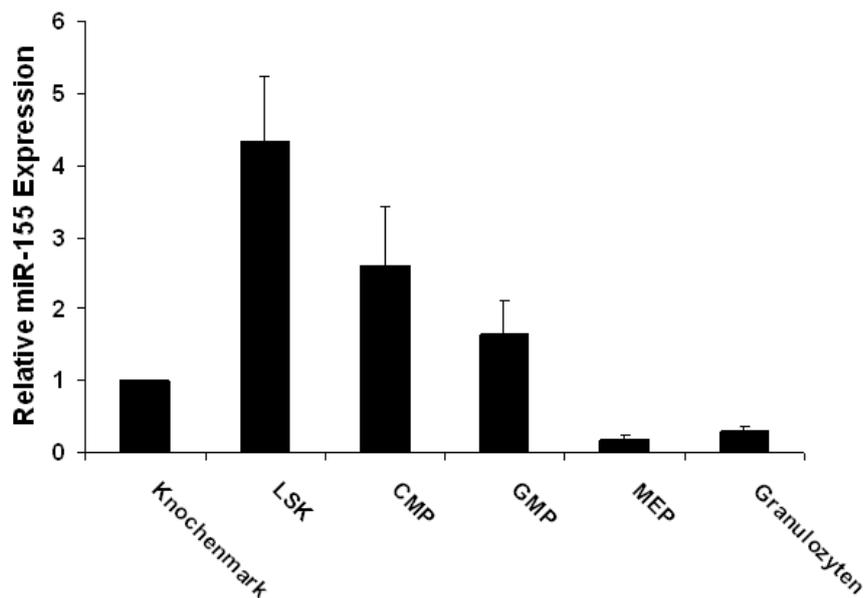


Abbildung 28: Die miR-155 Expression wird während der myeloiden Differenzierung herabreguliert. Darstellung der miR-155 Expression in sortierten Knochenmark-Populationen (LSK: Lin⁻ Sca⁺ Kit⁺; CMP: *Common Myeloid Progenitor*; GMP: *Granulocyte Macrophage Progenitor*; MEP: *Megakaryocyte Erythroid Progenitor* und Granulozyten). Je Messung wurde das Knochenmark von 3 C57BL/6 Mäusen gepoolt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus 3 unabhängigen Messungen \pm Standardabweichung. Alle Werte wurden zur snoRNA 135 normalisiert.

Zur weiteren Untersuchung der miR-155 Expression während der myeloiden Differenzierung wurden U937 Zellen als Modellsystem ausgewählt. Durch die Behandlung der Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) differenzieren U937 Zellen zu Monozyten / Makrophagen. Es wurden 1×10^6 Zellen mit 10 nM PMA bzw. Ethanol (Kontrolle) behandelt. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurde die RNA der Zellen präpariert und die Expression der miR-155 mittels qRT-PCR bestimmt. Es ist zu erkennen, dass die miR-155 Expression während der PMA induzierten myeloiden Differenzierung von U937 Zellen stark reduziert wird (Abbildung 29).

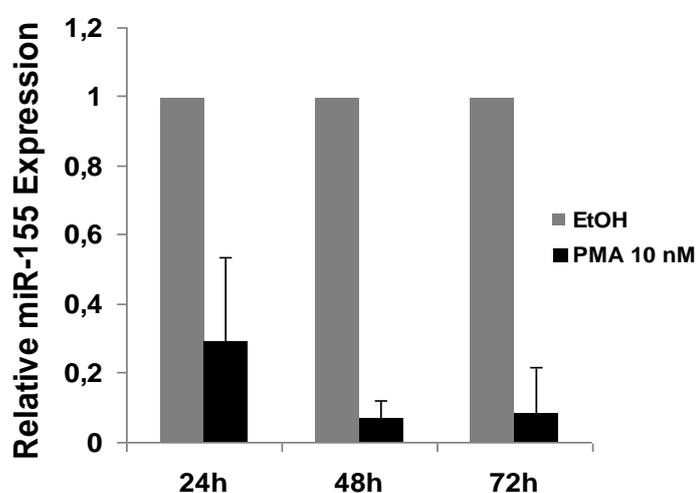


Abbildung 29: Die miR-155 Expression wird in der PMA induzierten myeloiden Differenzierung von U937 Zellen reprimiert. U937 Zellen wurden für 24 h, 48 h und 72 h mit 10 nM PMA oder EtOH (Kontrolle) behandelt. Die PMA induzierte myeloide Differenzierung der U937 Zellen führt zu einer starken Repression der miR-155 Expression. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung.

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse wurde der Einfluss einer erhöhten miR-155 Expression auf die myeloide Differenzierung untersucht. Dazu wurden U937 Zellen mittels Nukleofektion transient mit einem miR-155 Expressionskonstrukt (pcDNA6.2-miR-155) bzw. mit einem Kontrollkonstrukt (pcDNA6.2-scr) transfiziert. Nach 24 h wurde durch die Stimulation mit PMA (1 nM) die myeloide Differenzierung der U937 Zellen induziert. Die transfizierten Zellen wurden nach 24 h, 48 h und 72 h mittels Durchflusszytometrie auf die Expression des

myeloiden Differenzierungsmarker CD11b untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die miR-155 überexprimierenden U937 Zellen eine um ca. 25 % geringere CD11b Expression aufwiesen (Abbildung 30). Diese Daten lassen die Hypothese zu, dass die Reduktion der miR-155 notwendig für eine funktionierende myeloide Differenzierung ist.

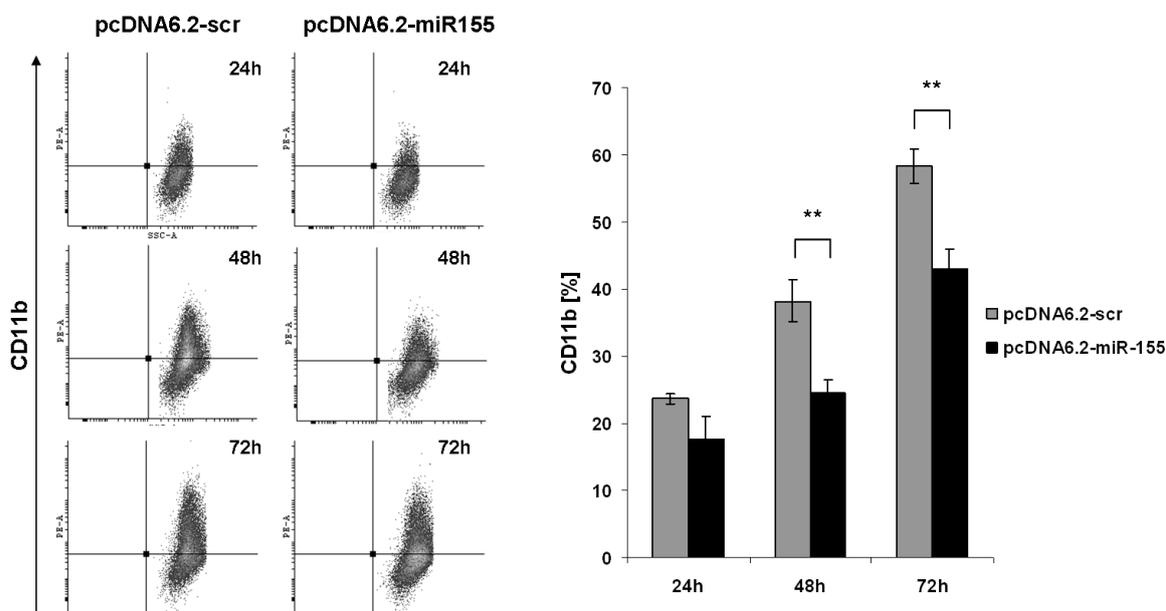


Abbildung 30: Die Überexpression der miR-155 reduziert die PMA induzierte myeloide Differenzierung von U937 Zellen. U937 Zellen wurden mit miR-155 Expressionsvektor (pcDNA6.2-miR-155) oder Kontrollvektor (pcDNA6.2-scr) transfiziert. Nach 24 h Stunden wurden die Zellen für 24 h, 48 h und 72 h mit PMA (1 nM) zur myeloiden Differenzierung stimuliert. Die *Dotplots* zeigen exemplarisch die Zunahme des myeloiden Differenzierungsmarkers CD11b. Die *Balken* repräsentieren den Mittelwert der CD11b Expression aus 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung (** $p \leq 0,01$).

3.2.9 PU.1 ist eine direktes Ziel der miR-155

Der Transkriptionsfaktor PU.1 ist einer der wichtigsten Regulatoren der myeloiden Differenzierung [145]. *In silico* Analysen zeigen, dass die 3'UTR der PU.1 mRNA eine putative Bindestelle der miR-155 beinhaltet (Abbildung 31A). Es ist bereits bekannt, dass PU.1 in FLT3-ITD assoziierten AMLs reprimiert wird [55, 62]. Daher wurde untersucht, ob eine Überexpression von FLT3-ITD, zur Reduktion des PU.1 Proteinlevels führt. Dazu wurde FLT3-WT bzw. FLT3-ITD in U937 Zellen transient überexprimiert. Nach 24 h wurde mittels Western Blot die Proteinmenge von PU.1 untersucht. Durch die Analysen konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von FLT3-ITD im Vergleich zu FLT3-WT zu einer Reduktion des PU.1 Proteins führt (Abbildung 31B). Da eine Überexpression von FLT3-ITD einerseits zur erhöhten miR-155 Expression (Abbildung 15) und andererseits zur Reduktion des PU.1 Protein, einem putativen Ziel der miR-155, führt, wurde untersucht, ob PU.1 ein direktes Ziel der miR-155 ist. Um den Einfluss der miR-155 auf PU.1 näher zu untersuchen, wurde die miR-155 in U937 Zellen transient überexprimiert. Nach 24h wurden die Proteine isoliert und mittels Western Blot analysiert. Hier konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der miR-155 zur Reduktion des PU.1 Protein führt (Abbildung 31C). Als nächstes stellte sich die Frage: Ist die miR-155 wichtig für die FLT3-ITD vermittelte PU.1 Suppression? Um diese Frage zu beantworten wurde die miR-155 in der FLT3-ITD assoziierte AML Zelllinie MV4;11 blockiert. Dazu wurden MV4;11 Zellen durch Nukleofektion mit Kontroll- (scr.) bzw. miR-155 spezifischen *Locked Nucleic Acids* (LNAs) transfiziert. Nach 24 h wurden die Proteine isoliert und PU.1 mittels Western Blot analysiert. Hier konnte gezeigt werden, dass der LNA-vermittelte miR-155 Block zu einer Zunahme des PU.1 Protein führt (Abbildung 31D).

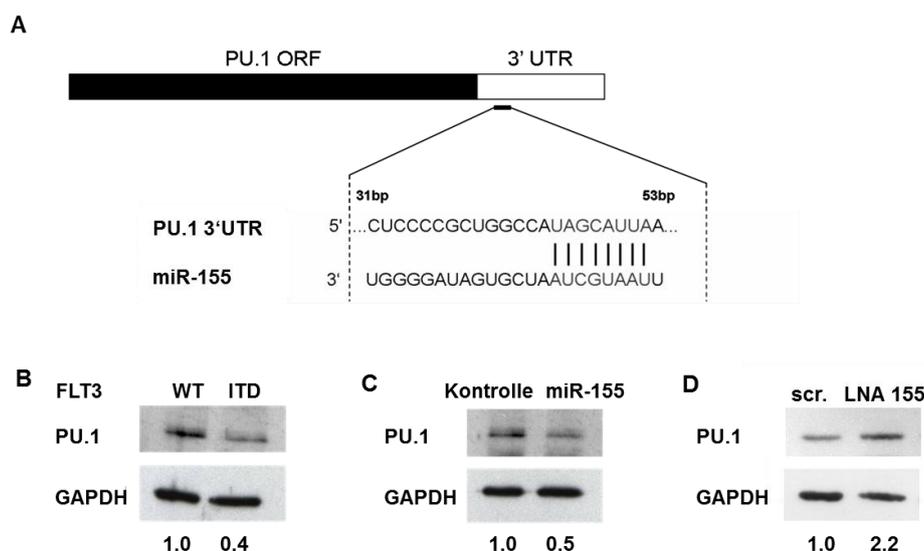


Abbildung 31: PU.1 ist eine putatives Ziel der miR-155. (A) Schematische Übersicht der putativen miR-155 Bindestelle in der PU.1 3'UTR. Die Überexpression von (B) FLT3-ITD bzw. (C) miR-155 in U937 Zellen führt zur Reduktion von PU.1. (D) Der LNA vermittelte *Knockdown* der miR-155 in MV4;11 Zellen erhöht die PU.1 Proteinmenge. Die Western Blot Analysen wurden 24 h nach Transfektion durchgeführt.

Um zu untersuchen, ob die miR-155 direkt an der PU.1 3'UTR bindet, wurde die PU.1 3'UTR in ein Luziferasekonstrukt kloniert (pRL-PU.1-3'UTR-WT). Zusätzlich wurde ein weiteres Luziferasekonstrukt kloniert (pRL-PU.1-2'UTR-Mut), bei dem durch den Austausch von einzelnen Nukleotiden eine Mutation in die PU.1 3'UTR eingefügt wurde (Abbildung 32A). Um die Bindung der miR-155 an der PU.1 3'UTR zu analysieren wurden die Luziferasekonstrukte allein oder mit dem pCDNA6.2-scr bzw. dem pCDNA6.2-miR-155 in 293T Zellen transfiziert. Nach 24 h wurde die Luziferaseaktivität der Zellen ermittelt. Hier konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der miR-155 nur in den Zellen mit dem Wildtyp PU.1 3'UTR Konstrukt zu einer hoch signifikanten Abnahme der Luziferaseaktivität führt (Abbildung 32B). Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die FLT3-ITD vermittelte Suppression von PU.1 durch die direkte Interaktion der miR-155 mit der PU.1 3'UTR ausgelöst wird.

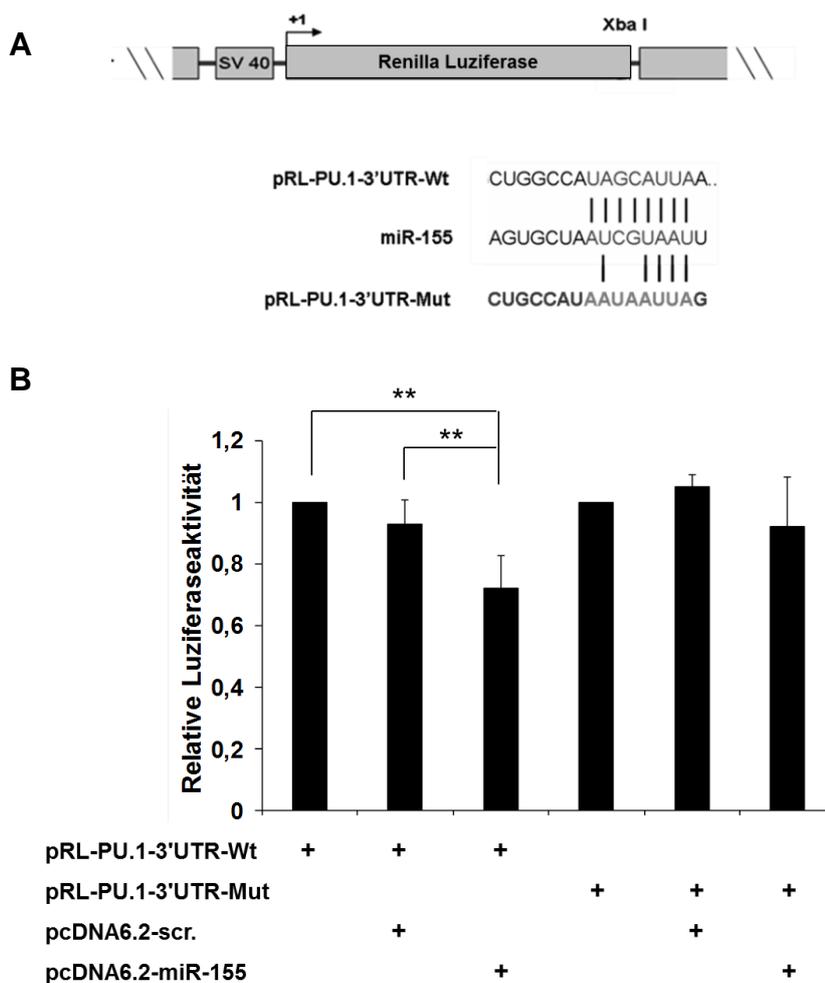


Abbildung 32: Die miR-155 bindet direkt an der PU.1 3'UTR. (A) Schematische Darstellung der PU.1 3'UTR Luciferasekonstrukte. Die PU.1 Wildtyp 3'UTR bzw. mutierte PU.1 3'UTR wurden in die XbaI Restriktionsseite des pRL Vektors kloniert. (B) 293T Zellen wurden mit dem Wildtyp (pRL-PU.1-3'UTR-Wt) oder dem mutierten (pRL-PU.1-3'UTR-Mut) PU.1 3'UTR Luciferasekonstrukt und der miR-155 (pcDNA6.2-miR-155) bzw. der Kontrolle (pcDNA6.2-scr.) co-transfiziert. Nach 24h wurde die Renilla Luciferaseaktivität gemessen und zur Firefly Luciferase normalisiert. Die Überexpression der miR-155 führt nur bei der Wildtyp PU.1 3'UTR zu einer Reduktion der Luciferaseaktivität. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus 5 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung (** $p \leq 0,01$).

3.2.10 Die miR-155 ist wichtig für die FLT3-ITD induzierte maligne Transformation

Mizuki et al. haben gezeigt, dass die stabile Expression von FLT3-ITD in murinen 32D Zellen zu einer Transformation der Zellen und einem IL-3 unabhängigen Wachstum führt [54]. Um zu untersuchen wie wichtig die miR-155 für FLT3-ITD

induzierte maligne Transformation ist, wurde die Koloniebildung von $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen in Methylzellulose Medium untersucht. Dazu wurden die $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen durch Nukleofektion mit 200 nM miR-155 spezifischen LNAs bzw. 200 nM Kontroll-LNAs transfiziert. 4 h nach der Transfektion wurden je 5000 Zellen in 3 ml Methylzellulose Medium ausplattiert und im Inkubator kultiviert. Nach 12 Tagen erfolgte die Auszählung der sichtbaren Kolonien. Hierbei war eine hoch signifikant geringere Anzahl der Kolonien bei den miR-155 LNA transfizierten $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen zu erkennen. Im Vergleich zu den Kontroll-LNA transfizierten Zellen konnten im Mittel 60 % weniger Kolonien gefunden werden (Abbildung 33).

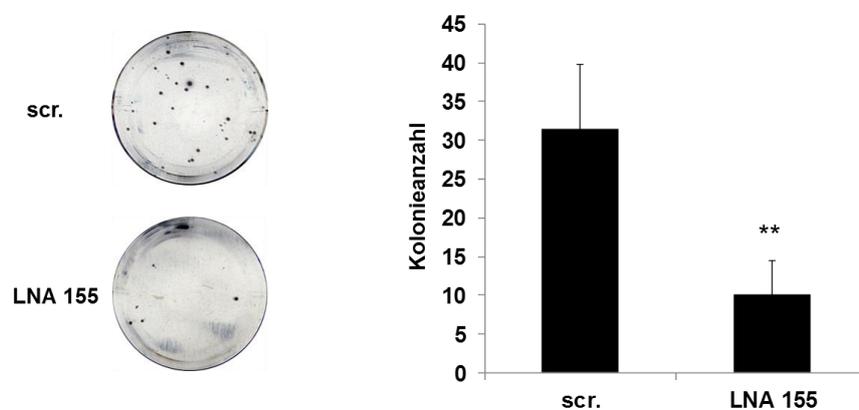


Abbildung 33: Der LNA vermittelte Block der miR-155 in $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen reduziert das Koloniewachstum. $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen wurden mit miR-155 spezifischen LNAs (200 nM) oder der Kontrolle (scr.) transfiziert. 4 h nach der Transfektion wurden Triplikate mit je 5000 Zellen in Methylzellulose ausgebracht. Nach 12 Tagen wurden die Kolonien analysiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung (** $p \leq 0,01$).

Zusätzlich zur transienten Inhibition der miR-155 mit LNAs, sollte auch der stabile *Knockdown* der miR-155 mittels lentiviraler Infektion von miRZip Konstrukten untersucht werden. Hierzu wurden $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen stabil mit einem pmiRZip-155 bzw. einem Kontroll Konstrukt (pmiRZip-scr.) infiziert. Da die Konstrukte ebenfalls für GFP und eine Puromycinresistenz kodieren, wurden die Zellen 5 Tage nach der Infektion mittels Durchflusszytometrie für GFP sortiert und anschließend mit Puromycin-haltigem Medium selektiert. Anschließend wurden je 1000 Zellen in Methylzellulose Medium ausplattiert und im Inkubator kultiviert. Nach 6 Tagen

wurden die Kolonien ausgezählt und dokumentiert. Die $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen mit dem stabilen miR-155 *Knockdown* zeigten eine im Mittel um 35 % reduzierte Koloniebildung im Vergleich zur Kontrolle(Abbildung 34).

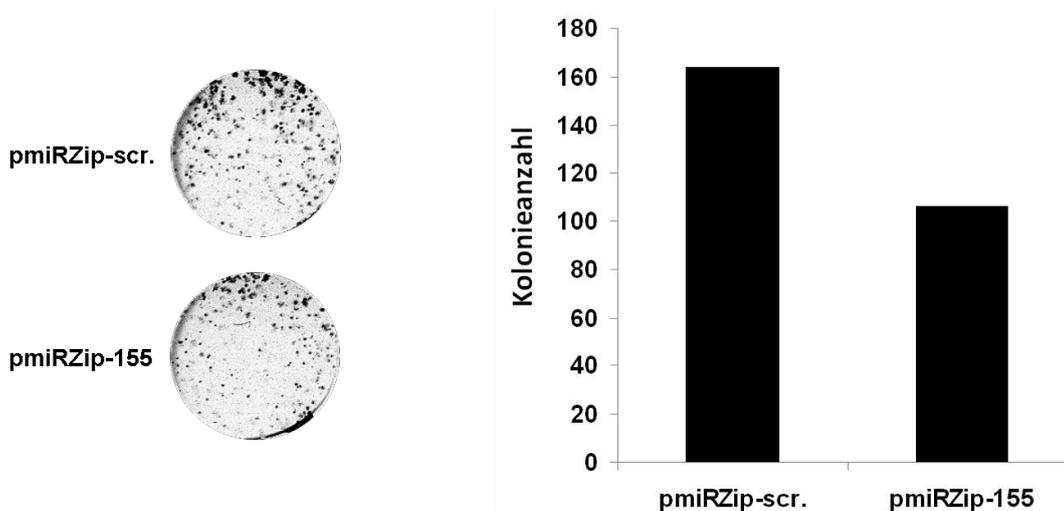


Abbildung 34: Der stabile *Knockdown* der miR-155 in $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen reduziert das Koloniewachstum. $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen wurden lentiviral mit dem miR-155 *Knockdown* Konstrukt (pmiRZip-155) oder dem Kontroll Konstrukt (pmiRZip-scr.) infiziert. Nach der Selektion wurden je 1000 Zellen als Triplikate in Methylzellulose ausgebracht. Nach 6 Tagen wurden die Kolonien analysiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus 2 unabhängigen Experimenten.

Um die funktionelle Relevanz der miR-155 für die FLT3-ITD induzierte Transformation weiter zu analysieren, wurde der Einfluss der miR-155 Inhibition auf die Proliferationsrate von AML Zellen untersucht. Dazu wurden je 1×10^5 stabil pmiRZip-155 bzw. pmiRZip-scr. infizierte $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen in Puromyzin-haltigem Selektionsmedium ausplattiert. Alle 24 h wurde die optische Dichte der Zellkultur bei 600 nm (OD600) gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass der *Knockdown* der miR-155 zu einer Reduktion der Proliferationsrate auf 72 % der miRZIP-Kontroll infizierten $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen führt (Abbildung 35).

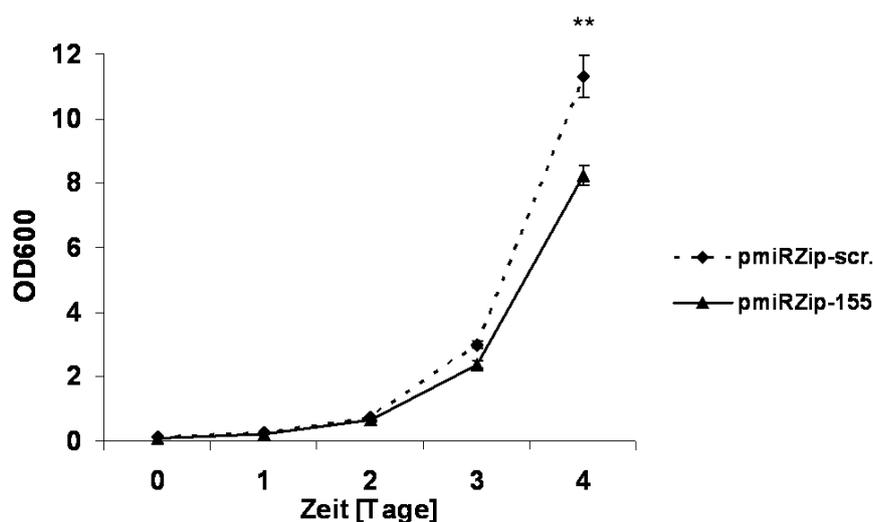


Abbildung 35: Der stabile *Knockdown* der miR-155 vermindert die Proliferation von 32D^{FLT3-ITD} Zellen. 32D^{FLT3-ITD} Zellen wurden lentiviral mit dem miR-155 *Knockdown* Konstrukt (pmiRZip-155) oder dem Kontroll Konstrukt (pmiRZip-scr.) infiziert. Nach der Selektion wurden je 1×10^5 Zellen in Kulturmedium angesetzt. Die Messung der optischen Dicht bei 600 nm erfolgte alle 24 h. Die Punkte der Wachstumskurve repräsentieren den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung (** $p \leq 0,01$).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Block der miR-155 zu einer Reduktion der Proliferation führt, sollte analysiert werden, ob die Inhibition der miR-155 auch einen Einfluss auf das Überleben von AML-Zellen hat. Hierzu wurden MV4;11 Zellen transient mit einem pmiRZip-155, zum *Knockdown* der miR-155, oder einem pmiRZip-scr. Konstrukt als Kontrolle transfiziert. Nach 48 h wurden apoptotische Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Dazu wurde ein Annexin V Assay verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der miR-155 in MV4;11 Zellen im Mittel zu einem 30 %igen Anstieg der apoptotischen Zellen führt (Abbildung 36).

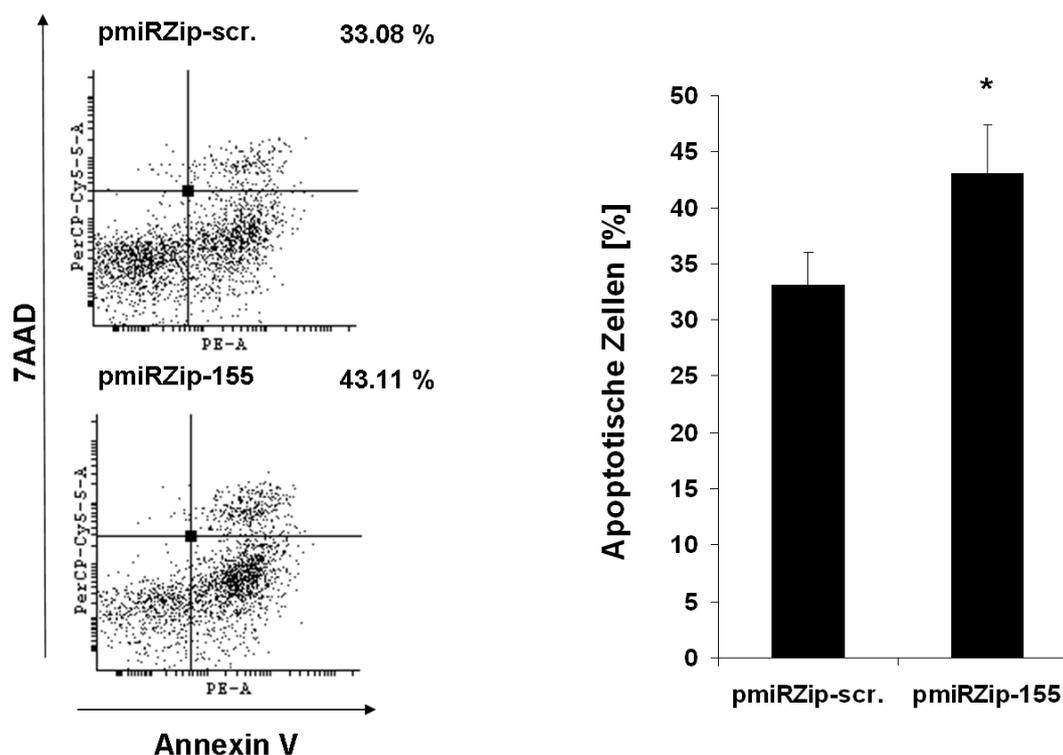


Abbildung 36: Der Block der miR-155 induziert Apoptose in MV4;11 Zellen. MV4;11 Zellen wurden transient mit dem miR-155 *Knockdown* Konstrukt (pmiRZip-155) oder dem Kontrollkonstrukt (pmiRZip-scr.) transfiziert. Nach 48h wurde der Anteil apoptotischer Zellen anhand von Durchflusszytometrie mittels Annexin V Assay bestimmt. Die Dotplots zeigen exemplarisch die Ergebnisse der Durchflusszytometrie. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. (* $p \leq 0,05$).

3.2.11 Die Überexpression des miR-155 Ziels PU.1 in FLT3-ITD assoziierten AML-Zellen induziert Apoptose

Da in dieser Arbeit bereits gezeigt wurde, dass der Block der miR-155 zu einer erhöhten PU.1 Proteinmenge (Abbildung 31D), sowie zu erhöhter Apoptose von FLT3-ITD assoziierten AML-Zellen führt (Abbildung 36), sollte untersucht werden ob die Überexpression von PU.1 ebenfalls zur erhöhten Apoptose von FLT3-ITD positiven AML-Zellen führt. Dazu wurde PU.1 transient in MV4;11 Zellen überexprimiert und nach 24 h durchflusszytometrisch mittels Annexin V Assay, der Anteil an apoptotischen Zellen bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression von PU.1 in MV4;11 Zellen zur Verdopplung der Anzahl an apoptotischen Zellen führt (Abbildung 37).

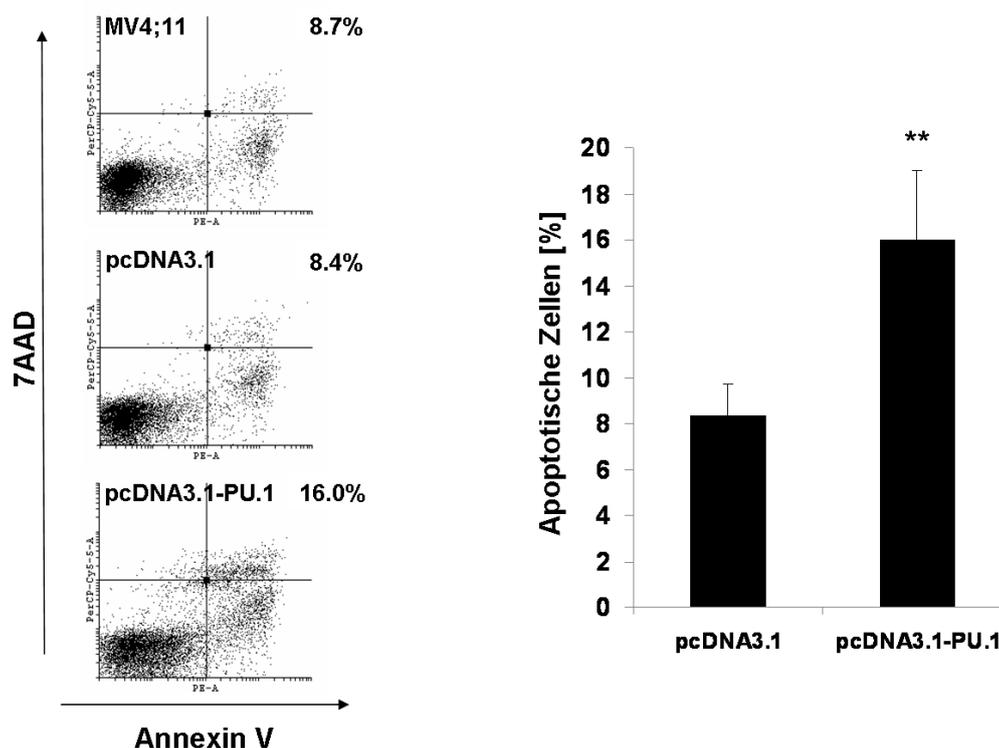


Abbildung 37: Die Überexpression von PU.1 in FLT3-ITD assoziierten MV4;11 Zellen induziert Apoptose. MV4;11 Zellen wurden transient mit einem PU.1 Expressionskonstrukt (pcDNA3.1-PU.1) oder Leervektor (pcDNA3.1) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mittels Annexin V Assay durchflusszytometrisch auf Apoptose analysiert. Die Überexpression von PU.1 führt zu einem hochsignifikanten Anstieg der apoptotischen Zellen. Die Dotplots zeigen exemplarisch die Ergebnisse der Durchflusszytometrie. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung (** $p \leq 0,01$).

3.3 Block der miR-155 als therapeutischer Ansatz in der FLT3-ITD assoziierten AML

3.3.1 Etablierung eines FLT3-ITD Mausmodells

Die bisherigen *in vitro* Analysen dieser Arbeit zeigen, dass die miR-155 durch FLT3-ITD aktivierte Signalwege induziert wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die miR-155 eine wichtige Rolle in der FLT3-ITD induzierten Transformation von AML Zellen spielt und der Block der miR-155 zu einer Reduktion der Proliferation sowie zu einer erhöhten Apoptoserate von leukämischen Zellen führt. Daher stellte sich die Frage, ob die miR-155 als therapeutisches Ziel in der FLT3-ITD assoziierten AML genutzt werden kann. Die hier vorgestellten *in vivo* Untersuchungen wurden am Max Bürger Zentrum in Leipzig in Kooperation mit der

Arbeitsgruppe von Dr. Stefan Fricke vom Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie durchgeführt. Für diese Untersuchungen, sollte ein FLT3-ITD Mausmodell genutzt werden, welches von Mizuki et al. publiziert wurde [54]. Durch die Injektion von 1×10^6 $32D^{FLT3-WT}$ oder $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen in die Schwanzvene von syngenen C3H/HeN Mäusen entwickeln die Tiere eine leukämische Erkrankung und versterben. Werden die ursprünglichen 32D Zellen appliziert, wird keine leukämische Erkrankung ausgebildet. In den Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Tiere die die $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen injiziert bekamen in einem Zeitraum von 20 - 21 Tagen an einer leukämischen Erkrankung verstarben. Die Tiere, die die $32D^{FLT3-WT}$ Zellen injiziert bekamen, überlebten zwischen 53 - 57 Tage und verstarben dann ebenfalls an einer leukämischen Erkrankung (Abbildung 38).

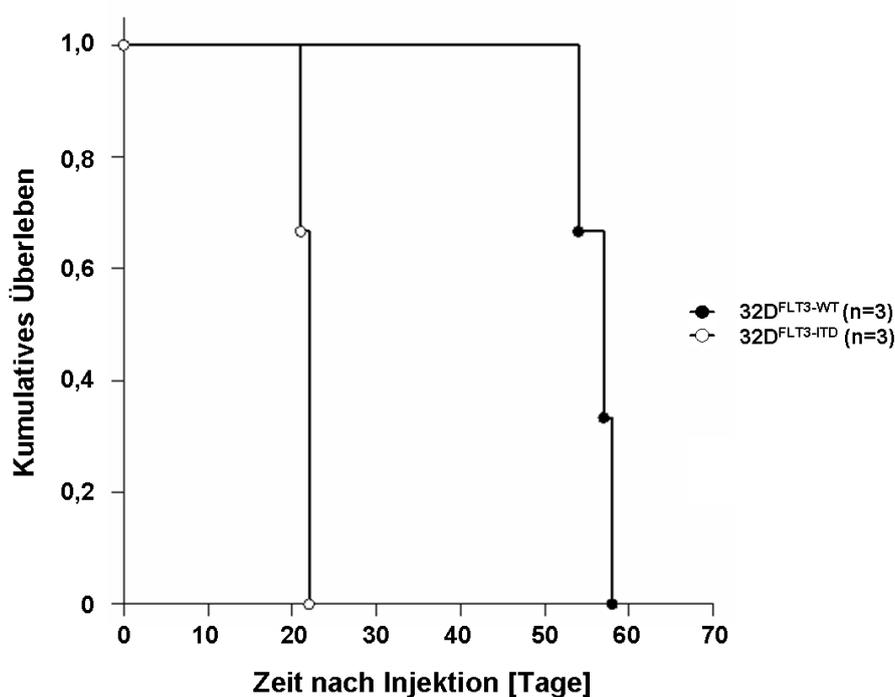


Abbildung 38: Die Injektion von FLT3 überexprimierenden 32D Zellen in C3H Mäuse, führt zur Induktion einer leukämischen Erkrankung. Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt das kumulative Überleben von C3H Mäusen nach Injektion von 1×10^6 $32D^{FLT3-WT}$ bzw. $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen. Die FLT3-ITD exprimierenden Zellen führen zu einem aggressiveren Verlauf der leukämischen Erkrankung und einem früherem Versterben der Tiere.

Die Tiere beider Gruppen zeigten kurz vor dem Tod einen Anstieg der Leukozyten im peripheren Blut. Die Akkumulation der Leukozyten spiegelt die Zunahme der 32D Zellen im Blut wider. Da die $32D^{FLT3-WT}$ bzw. $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen ein humanes FLT3 (huCD135) exprimieren, konnte die Akkumulation der Zellen im peripheren Blut mit einem anti-humanen CD135-Antikörper mittels Durchflusszytometrie analysiert werden. Hier ist deutlich zu erkennen, dass sich die FLT3-ITD exprimierenden 32D Zellen deutlich schneller im peripheren Blut ansammeln als die FLT3-WT exprimierenden 32D Zellen (Abbildung 39). Diese Daten spiegeln auch die höhere Aggressivität und die schlechtere Prognose einer FLT3-ITD assoziierten AML wider.

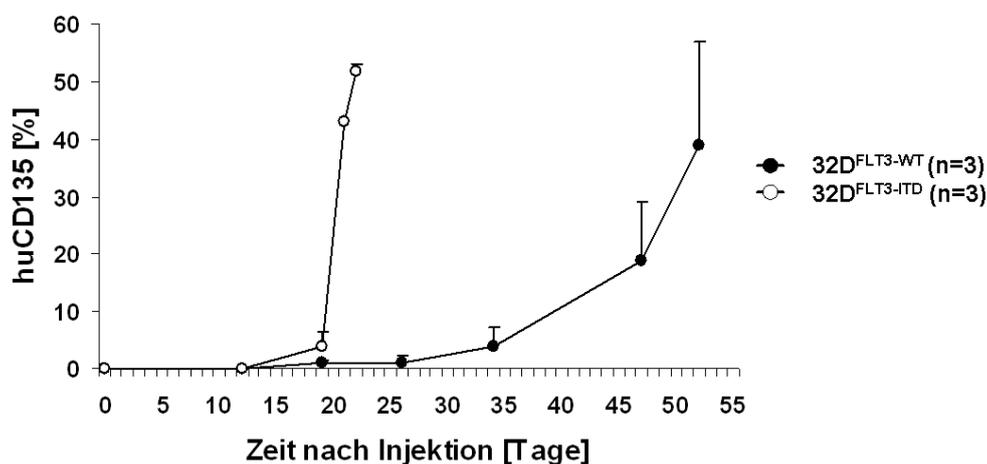


Abbildung 39: Akkumulation von FLT3 exprimierenden 32D Zellen im peripheren Blut von C3H Mäusen. Je 1×10^6 $32D^{FLT3-WT}$ bzw. $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen wurden in C3H Mäuse injiziert. Die Akkumulation der leukämischen Zellen im Blut wurde durch die Detektion des humanen FLT3 (huCD135) mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Datenpunkte zeigen den Mittelwert der ermittelten CD135 positiven Zellen im peripheren Blut \pm Standardabweichung.

Nach dem Tod wurden die Tiere sezziert und analysiert. Die Tiere beider Gruppen (FLT3-WT, FLT3-ITD) zeigten eine vergrößerte Milz sowie eine vergrößerte Leber (Abbildung 40).

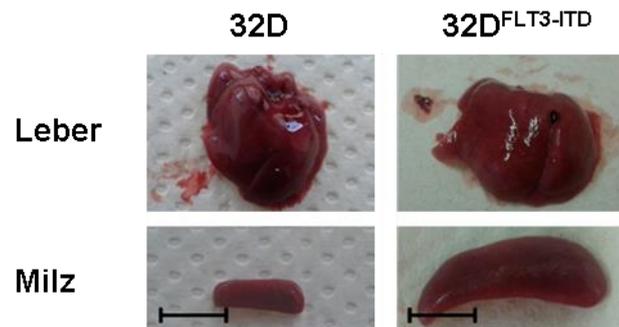


Abbildung 40: Die Injektion von FLT3 überexprimierenden 32D Zellen führt zu einer Hepatosplenomegalie. Links normal große Leber und Milz aus nicht erkrankten Tieren 60 Tage nach Injektion von ursprünglichen 32D Zellen. Rechts exemplarische Darstellung für die vergrößerte Leber und Milz von Mäusen mit leukämischer Erkrankung nach Injektion von FLT3 überexprimierenden 32D Zellen (hier 32D^{FLT3-ITD}). Der dargestellte Größenbalken entspricht 1 cm.

Die vorherigen Daten zeigen, dass die miR-155 die Zellproliferation und die leukämische Zelltransformation in der FLT3-ITD assoziierten AML fördert. Daher stellte sich die Frage ob die miR-155 als therapeutisches Ziel genutzt werden könnte. Um dies zu untersuchen, sollte die miR-155 im vorher beschriebenen FLT3-ITD assoziierten AML Mausmodell blockiert werden. Hierzu wurden zwei Ansätze gewählt: 1. Der Block durch eine miR-155 spezifische LNA; 2. Der Block durch die lentivirale Infektion mit einem miR-155 spezifischen miRZip Vektor.

3.3.2 LNA-vermittelter Block der miR-155 im FLT3-ITD assoziierten AML Mausmodell

LNAs sind modifizierte RNA Moleküle, bei deren Ribose Einheit das 2' Sauerstoffmolekül und das 4' Kohlenstoffmolekül durch eine zusätzliche Brücke miteinander verknüpft sind. Dadurch wird die Ribose in der 3'-endo Konformation fixiert und ist strukturell unflexibler als das unmodifizierte Analogon. Dies erhöht signifikant die Hybridisierungseigenschaften und führt zur Resistenz gegenüber Endo- und Exonukleasen [140-141]. Durch die komplementäre Bindung von LNAs an spezifische miRNAs wird die Funktion der miRNAs unterbunden [146]. Es konnte bereits in verschiedenen Publikationen gezeigt werden, dass LNAs ein hohes therapeutisches Potenzial besitzen [120, 147-149]. Daher sollte untersucht

werden, ob der LNA vermittelte Block der miR-155 in $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen zu einer Reduktion der leukämischen Erkrankung im C3H Mausmodell führen kann. Dazu wurden die $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen mittels Nukleofektion mit 200 nM miR-155 spezifischer LNA oder scramble LNA (Kontrolle) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h kultiviert. Anschließend wurden jeweils 1×10^6 $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen über die Schwanzvene in 5 Tiere pro Gruppe (LNA bzw. Kontrolle (scr)) injiziert. Die Tiere wurden täglich auf Gewicht, Verhalten und Aussehen untersucht. Einmal in der Woche wurde den Tieren Blut abgenommen und ein Blutbild sowie eine durchflusszytometrische Analyse erstellt. Nach dem Tod wurden die Tiere sezirt und die Milz, die Leber und das Knochenmark mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Tiere beider Gruppen verstarben nach 15 - 21 Tagen, so dass zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied im Überleben zu erkennen ist (Abbildung 41).

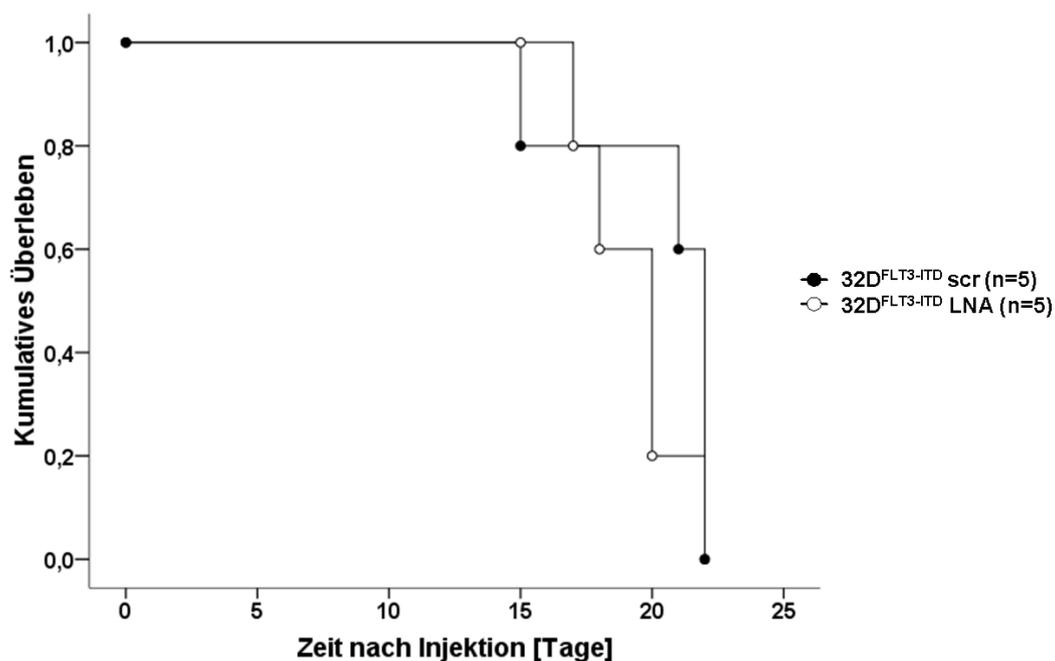


Abbildung 41: Überlebenskurven nach LNA-vermitteltem miR-155 Block. Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt das kumulative Überleben der C3H Mäuse nach Injektion von leukämischen $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen. Die Zellen wurden 24 h vor der Injektion mit miR-155 spezifischen LNAs bzw. mit einer unspezifischen Kontrolle (scr) transfiziert. Es ist kein signifikanter Unterschied im Überleben der Tiere zwischen den beiden Gruppen (scr, LNA) zu erkennen.

Die Zunahme der leukämischen Zellen ($32D^{FLT3-ITD}$) im peripheren Blut bzw. die Akkumulation in Milz, Leber und Knochenmark wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dazu wurde ein anti-humaner CD135 (FLT3) Antikörper verwendet,

der spezifisch am, von den 32D^{FLT3-ITD} Zellen exprimierten, humanen FLT3 bindet. Die Analysen des peripheren Blutes am Tag 12 und Tag 18 nach der Injektion zeigen in beiden Gruppen eine deutliche Zunahme der leukämischen Zellen. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen in der Anzahl der leukämischen Zellen zu erkennen (Abbildung 42).

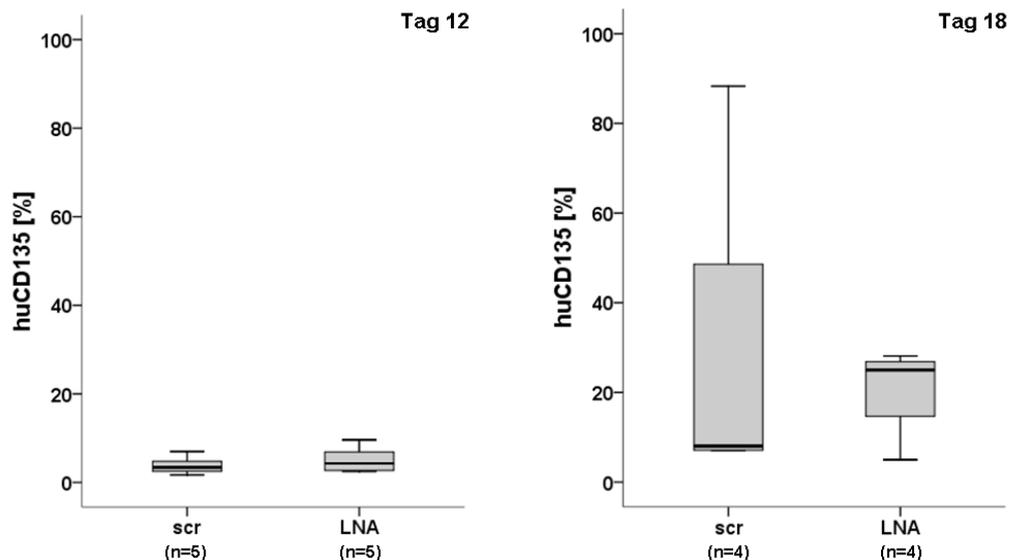


Abbildung 42: Analyse der Zunahme von leukämischen Zellen im peripherem Blut von C3H Mäusen. Die durchflusszytometrischen Analysen mittels anti-humanen CD135-Antikörper zeigen die Zunahme der leukämischen 32D^{FLT3-ITD} Zellen im peripheren Blut von C3H Mäusen am Tag 12 und 18 nach Injektion. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (scr, LNA) zu erkennen.

Nach dem Tod der Tiere wurden das Knochenmark, die Milz und die Leber untersucht. Die Tiere beider Gruppen hatten zum Todeszeitpunkt eine stark vergrößerte Milz und Leber (vgl. Abbildung 40 links). Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu erkennen (Abbildung 43).

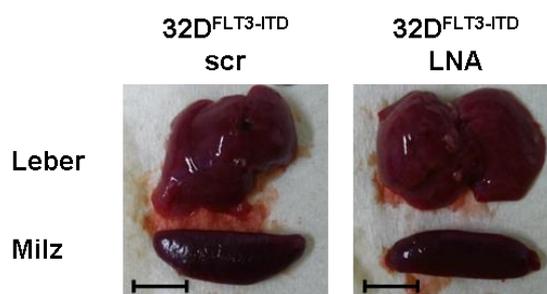


Abbildung 43: Analyse von Milz und Leber nach LNA vermitteltem miR-155 Block im $32D^{FLT3-ITD}$ C3H Mausmodell. In beiden Gruppen (scr, LNA) entwickelten die Tiere eine Hepatosplenomegalie. Es ist kein signifikanter Unterschied in der Größe der Leber bzw. Milz zwischen den Gruppen festzustellen. Der Größenbalken entspricht 1 cm.

Die durchflusszytometrischen Analysen zeigen einen signifikant höheren Anteil an leukämischen Zellen im Knochenmark der Tiere aus der Kontrollgruppe (scr) (Abbildung 44). In der Milz konnte bei beiden Gruppen ein hoher Anteil an leukämischen Zellen nachgewiesen werden, jedoch ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu erkennen (Abbildung 44). Auch in der Leber der Tiere konnten viele leukämische Zellen nachgewiesen werden, hier ist ebenfalls die Tendenz zu erkennen, dass in den Tieren der Kontrollgruppe mehr leukämische Zellen in der Leber akkumuliert waren (Abbildung 44).

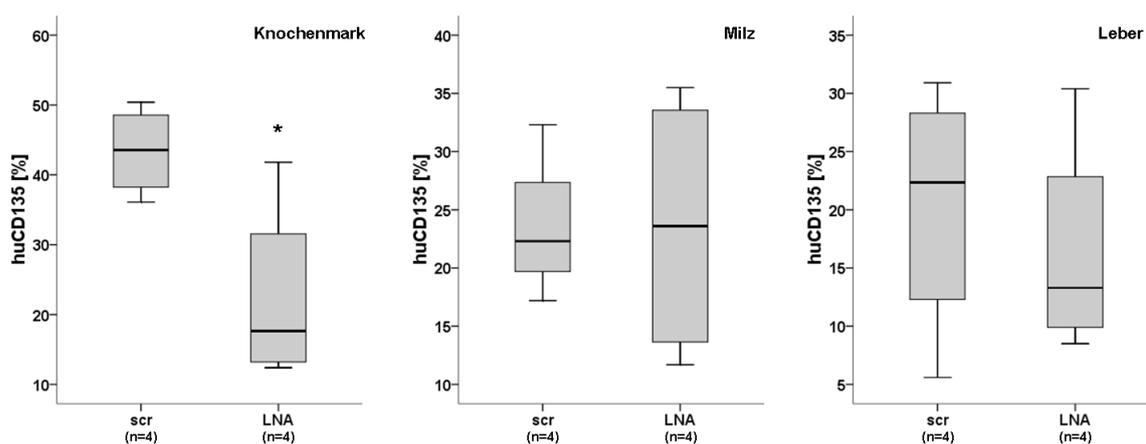


Abbildung 44: Analyse der Akkumulation von leukämischen $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen im Knochenmark, Milz und Leber von C3H Mäusen. Die durchflusszytometrischen Analysen zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant geringere Anzahl an LNA transfizierten $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen im Knochenmark der C3H Mäuse. In der Milz ist kein Unterschied zu erkennen. In der Leber ist der Trend einer geringeren Anzahl von LNA behandelten $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen (* $p \leq 0,05$).

3.3.3 Lentiviraler *Knockdown* der miR-155 im FLT3-ITD assoziierten AML Mausmodell

Neben dem LNA vermittelten Block sollten auch die Effekte eines stabilen *Knockdowns* der miR-155 im 32D^{FLT3-ITD} C3H Mausmodell untersucht werden. Dazu wurden 32D^{FLT3-ITD} Zellen lentiviral mit einem Kontrollkonstrukt (pmiRZip-scr.) oder einem miR-155 inhibierendem Konstrukt (pmiRZip-155) infiziert. Die infizierten 32D Zellen wurden anschließend für 3 Tage kultiviert. Da die pmiRZip-Vektoren auch für GFP und eine Puromycinresistenz kodieren, wurden die infizierten Zellen anhand des GFP mittels Durchflusszytometrie sortiert und anschließend durch Puromycin selektiert. Um zu untersuchen, ob ein stabiler *Knockdown* der miR-155 zur Reduktion einer durch 32D^{FLT3-ITD} Zellen induzierten leukämischen Erkrankung führt, wurden je 1×10^6 pmiRZip-scr. oder pmiRZip-155 infizierte 32D^{FLT3-ITD} Zellen über die Schwanzvene in C3H Mäuse injiziert. Jede Gruppe bestand aus 6 Tieren. Die Tiere wurden täglich auf Gewicht, Verhalten und Aussehen untersucht. Einmal in der Woche wurde den Tieren Blut entnommen und ein Blutbild sowie eine durchflusszytometrische Analyse erstellt. Nach dem Tod wurden die Tiere sezziert und die Milz, die Leber und das Knochenmark mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Tiere beider Gruppen verstarben nach 17-24 Tagen (Abbildung 45). Beim Überleben der Tiere kann kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (pmiRZip-scr., pmiRZip-155) festgestellt werden.

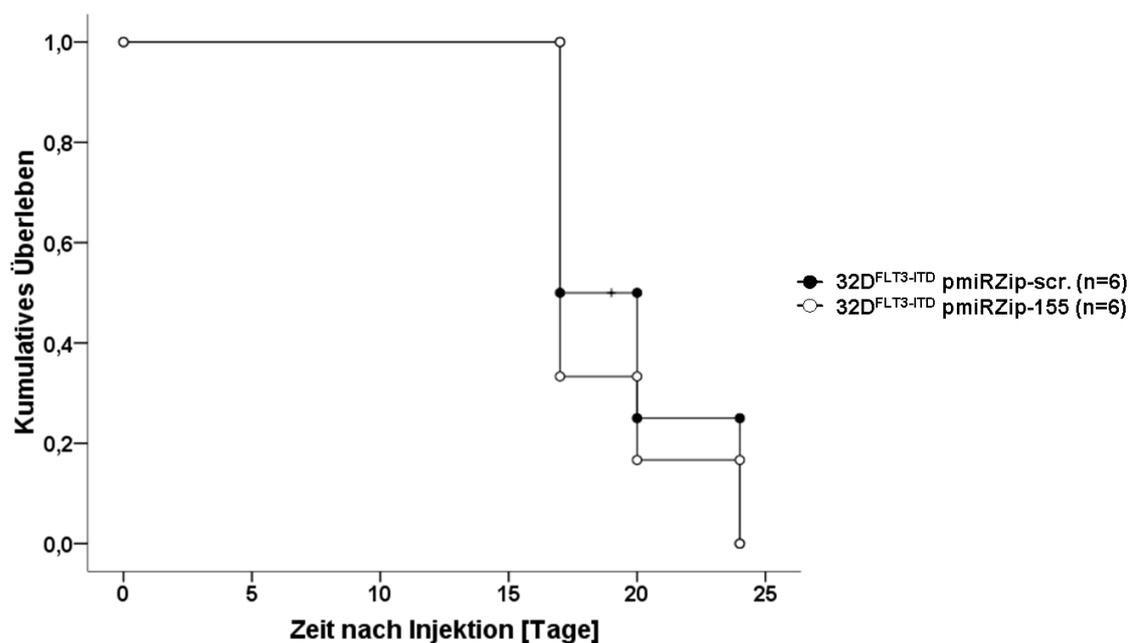


Abbildung 45: Überlebenskurven nach miRZip vermittelten miR-155 Block. Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt das kumulative Überleben der C3H Mäuse nach Injektion von leukämischen 32D^{FLT3-ITD} Zellen. Die Zellen wurden lentiviral mit pmiRZip-scr. (Kontrolle) bzw. pmiRZip-155. infiziert und mittels Durchflusszytometrie und Puromycin selektiert. Es ist kein signifikanter Unterschied im Überleben der Tiere zwischen den beiden Gruppen (pmiRZip-scr., pmiRZip-155) zu erkennen.

Die Analyse der leukämischen Zellen im peripheren Blut erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Untersuchungen vom Tag 12 und 19 zeigen die Zunahme der leukämischen Zellen im peripheren Blut der C3H Mäuse. Am Tag 12 ist kein Unterschied beim Anteil der malignen Zellen im Blut festzustellen. Am Tag 19 zeigen die Tiere der Kontrollgruppe im Mittel annähernd doppelt so viele (25,1 %) leukämische 32D^{FLT3-ITD} Zellen im Blut wie die miRZip-155-Gruppe (13,5 %) (Abbildung 46).

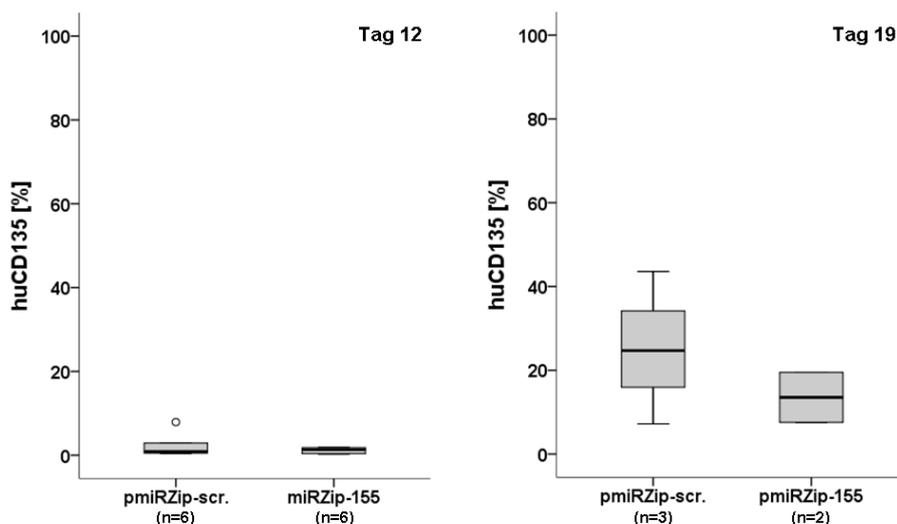


Abbildung 46: Analyse der Zunahme von leukämischen Zellen im peripherem Blut von C3H Mäusen. Die durchflusszytometrischen Analysen mittels anti humanen CD135 Antikörper zeigen die Zunahme der leukämischen 32DFLT3-ITD Zellen im peripheren Blut von C3H Mäusen am Tag 12 und 19 nach Injektion. Am Tag 19 sind im Blut der Tiere, welche die mit pmirZip-155 infizierten 32DFLT3-ITD injiziert bekamen, ca. 50 % weniger leukämische Zellen nachweisbar (○ Ausreißer).

Nachdem die Tiere verstorben waren, wurden die Milz, die Leber und das Knochenmark präpariert und näher analysiert. Alle Tiere in beiden Gruppen zeigten eine stark vergrößerte Milz sowie eine vergrößerte Leber (Abbildung 47). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden.

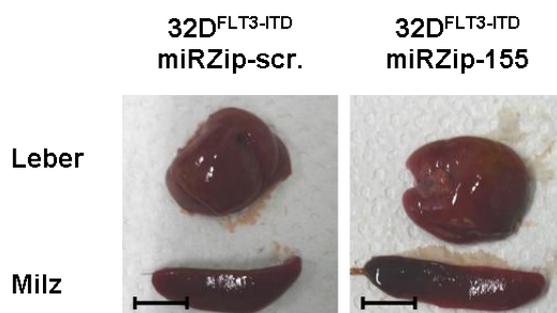


Abbildung 47: Analyse von Milz und Leber nach miRZip-155 vermitteltem Block der miR-155 im 32D^{FLT3-ITD} C3H Mausmodell. In beiden Gruppen (pmirZip-scr., pmirZip-155) entwickelten die Tiere eine Hepatosplenomegalie. Es ist kein signifikanter Unterschied in der Größe der Leber bzw. Milz zwischen den Gruppen festzustellen. Der Größenbalken entspricht 1 cm.

Nach der Präparation der gestorbenen Tiere wurden das Knochenmark, die Milz und die Leber mittels anti-human CD135-Antikörper basierender Durchflusszytometrie auf die Akkumulation von leukämischen $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen untersucht. Die Daten zeigen eine tendenziell geringere Akkumulation der $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen mit pmiRZip-155 im Knochenmark, Milz und Leber (Abbildung 48). Vergleicht man die Mittelwerte der leukämischen Zellen der pmiRZip-155 Gruppe findet man im Knochenmark 18 %, in der Milz 23 % und in der Leber 24 % weniger $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen als in der Kontrollgruppe.

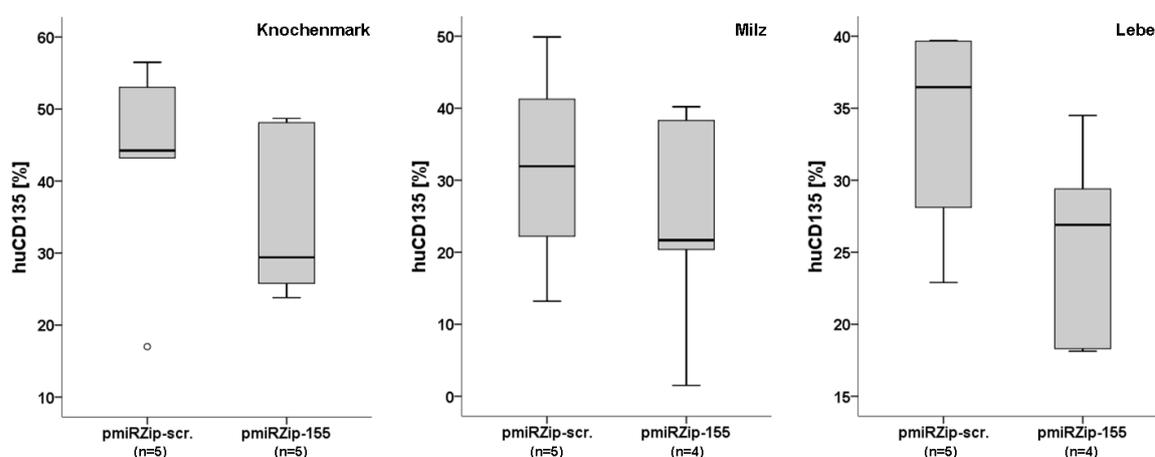


Abbildung 48: Analyse der Akkumulation von leukämischen $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen im Knochenmark, Milz und Leber von C3H Mäusen. Die durchflusszytometrischen Analysen zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine geringere Anzahl an miRZip-155 exprimierenden $32D^{FLT3-ITD}$ Zellen im Knochenmark, Leber und Milz der C3H Mäuse (○ Ausreißer).

Die Daten der durchgeführten Experimente zeigen, dass der Block der miR-155 tendenziell zur Reduktion von FLT3-ITD assoziierten leukämischen Zellen *in vivo* führt. Somit kann man schlussfolgern, dass die miR-155 ein potenzielles neues therapeutisches Ziel in der akuten myeloischen Leukämie mit FLT3-ITD Mutationen darstellt.

4. Diskussion

Die hämatopoetische Differenzierung ist ein sehr komplexer Prozess, bei dem viele Regulationsmechanismen zum tragen kommen. Die Störung dieser Prozesse durch Mutationen oder die Deregulation von einzelnen Bestandteilen führen zu einer fehlerhaften Hämatopoese und kann so eine Leukämie auslösen. MicroRNAs sind an vielen wichtigen Regulationsmechanismen in der Hämatopoese bzw. Leukämogenese beteiligt. Daher sollte zu Beginn der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welche miRNAs während der hämatopoetischen Differenzierung reguliert werden. Dazu wurde die miRNA Expression mittels miRNA Microarray, während der MCSF induzierten myeloiden Differenzierung von primären humanen CD34 positiven Vorläuferzellen untersucht. In 2 unabhängigen Experimenten wurden 137 miRNAs als signifikant verändert exprimiert gefunden (Abbildung 11). Eine der am stärksten regulierten miRNAs während der myeloiden Differenzierung, war die miR-155. Da bereits in verschiedenen Studien eine Assoziation der miR-155 mit verschiedenen malignen Erkrankungen gezeigt wurde [103-104, 150-153], sollte in der vorliegenden Arbeit die Regulation und die Funktion der miR-155 im myeloiden System bzw. bei der akuten myeloischen Leukämie untersucht werden.

4.1 Regulatorische Analysen der miR-155 in der FLT3-ITD assoziierten AML

Zur näheren Untersuchung der miR-155 wurde das Knochenmark von 56 AML Patienten und von 3 gesunden Spendern auf die Expression der miR-155 untersucht. Die Daten zeigen, dass die miR-155 in den meisten AML Patientenproben deutlich höher exprimiert ist, als in den Proben der gesunden Spender (Abbildung 12). Diese Ergebnisse werden von anderen Arbeiten unterstützt, in denen ebenfalls eine erhöhte Expression der miR-155 in AML Patientenproben nachgewiesen werden konnte [126, 131]. In den weiteren Analysen wurden Patientenproben anhand verschiedener prognostischer Faktoren (FLT3-ITD, NPM1 Mutation, inv.16, t(15;17) und t(8;21)) unterteilt und die Expression der miR-155 untersucht (Abbildung 13). Es ist deutlich zu erkennen, dass die miR-155 in den Patientenproben mit einer FLT3-ITD Mutation am höchsten exprimiert ist. Die Korrelation einer erhöhten miR-155 Expression mit der FLT3-ITD Mutation wurde in den letzten Jahren von verschiedenen Gruppen

publiziert [126-131, 154]. Zusätzlich konnte in einer größeren Kohorte von AML Patientenproben, geordnet nach ihrem FLT3 Status (FLT3-WT, FLT3-TKD, FLT3-TKD/ITD und FLT3-ITD) gezeigt werden, dass die miR-155 in den FLT3-ITD assoziierten Proben signifikant höher exprimiert ist als in Proben von gesunden Spendern bzw. in AML Patientenproben mit FLT3-WT oder FLT3-TKD Mutation (Abbildung 14).

Aufgrund dieser Ergebnisse sollte die Regulation und die Funktion der miR-155 in der FLT3-ITD assoziierten AML untersucht werden. Garzon et al. konnten in ihren Untersuchungen keinen regulatorischen Einfluss durch FLT3-ITD auf die miR-155 Expression nachweisen [128]. Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Überexpression von FLT3-ITD zu einer Induktion der miR-155 Expression führt, während die Überexpression von FLT3-WT bzw. der FLT3-TKD Mutation keine Induktion bzw. die Reduktion der miR-155 Expression bewirkt (Abbildung 15). Der Block der FLT3 Tyrosinkinaseaktivität durch verschiedene Proteinkinaseinhibitoren führt zu einer starken Reduktion der miR-155 Expression in der FLT3-ITD assoziierten AML Zelllinie MV4;11 (Abbildung 17). Zusammenfassend zeigen die Daten einen Einfluss der FLT3-ITD induzierten Signalwege auf die miR-155 Expression.

Ein wichtiger Faktor in der FLT3-ITD assoziierten AML ist STAT5. STAT5 ist ein Transkriptionsfaktor, der an vielen Prozessen in der normalen sowie in der pathogenen Hämatopoese beteiligt ist [155-156]. Es wurde vielfach gezeigt, dass die FLT3-ITD Mutation eine starke konstitutiven Aktivierung von STAT5 bewirkt, während die Stimulation von FLT3-WT durch den FLT3 Liganden sowie die FLT3-TKD Mutation lediglich zu einer leichten Aktivierung von STAT5 führt [50, 54, 56-57]. Da die miR-155 Expression nur nach Überexpression von FLT3-ITD oder in FLT3-ITD assoziierten Patientenproben erhöht war, also in Zellen mit aktiviertem STAT5, wurde die Rolle von STAT5 bei der Regulation der miR-155 näher untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl der STAT5 Block durch einen STAT5 Inhibitor als auch der siRNA vermittelte Block von STAT5 zur Reduktion der miR-155 Expression in FLT3-ITD assoziierten AML Zellen führt (Abbildung 18, Abbildung 19). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der induzierte STAT5 *Knockout* im FLT3-ITD Mausmodell die miR-155 Expression deutlich mindert

(Abbildung 20). Kopp et al. haben gezeigt, dass STAT5 eine wichtige Rolle bei der miR-155 Regulation, im kutanen T-Zell-Lymphom spielt [108]. Hierbei konnten sie zeigen, dass STAT5 am Promotor der miR-155 bindet und die Expression der miR-155 induziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in MV4;11 Zellen mittels Chromatinimmunopräzipitation die Bindung von STAT5 am Promotor der miR-155 untersucht. Hierbei konnte jedoch keine Bindung von STAT5 nachgewiesen werden.

Ein weiterer Faktor, der in der Regulation der miR-155 eine Rolle spielt ist NF- κ B (p65). In früheren Arbeiten wurde bereits beschrieben, dass NF- κ B durch direkte Bindung am miR-155 Promotor zur Induktion der miR-155 Expression während der inflammatorischen Antwort auf eine Epstein-Barr Virus Infektion führt [105-106]. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass NF- κ B in der akuten myeloischen Leukämie [142-143, 157] konstitutiv aktiv ist und dass FLT3-ITD induzierte Signalwege zur Aktivierung von NF- κ B führen [58-59]. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der Block von NF- κ B (p65) zur Reduktion der miR-155 Expression führt (Abbildung 21). Weiterhin wurde mittels Promotor Luziferase Assay und Chromatinimmunopräzipitation gezeigt, dass NF- κ B (p65), in FLT3-ITD assoziierten AML Zellen durch die direkte Bindung am miR-155 Promotor zu dessen Aktivierung führt (Abbildung 25, Abbildung 26, Abbildung 27). Zusätzlich konnte durch Chromatinimmunopräzipitation gezeigt werden, dass die Bindung von NF- κ B (p65) am miR-155 Promotor abhängig von FLT3-ITD induzierten Signalwegen ist. So konnte nach Block der FLT3-ITD Tyrosinkinaseaktivität durch CEP701 keine Bindung von NF- κ B am miR-155 Promotor mehr nachgewiesen werden (Abbildung 26). Diese Daten werden von verschiedenen Publikationen unterstützt, die zeigen dass der Block von FLT3 Signalwegen durch Silvesterol [158] bzw. der Block von NF- κ B durch MLN4924 [73] in der FLT3-ITD assoziierten AML zu einer Reduktion der miR-155 Expression führt.

Da STAT5 einen starken Einfluss auf die miR-155 Expression zeigte, aber keine direkte Bindung von STAT5 am miR-155 Promotor nachgewiesen werden konnte, sollte analysiert werden wie STAT5 funktionell an der miR-155 Regulation beteiligt ist. In Abbildung 22 ist zu erkennen, dass der siRNA vermittelte *Knockdown* von

STAT5 und NF- κ B (p65) zur Inhibition der FLT3-ITD induzierten miR-155 Expression führt. Dieser Effekt addiert sich, wenn STAT5 und NF- κ B (p65) gleichzeitig blockiert werden. Dies wurde als ein erster Hinweis dafür gesehen, dass NF- κ B (p65) und STAT5 synergistisch zusammen wirken. Bei den weiteren Analysen zum Zusammenwirken von NF- κ B (p65) und STAT5 wurde mittels Promotorluziferase Assay die Aktivierung des miR-155 Promotor nach Überexpression von NF- κ B (p65) und STAT5 untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass NF- κ B (p65) allein zur Aktivierung des miR-155 Promotors führt (Abbildung 27). Da STAT5 in der FLT3-ITD assoziierten AML konstitutiv aktiv vorliegt, wurde zur Untersuchung ein STAT5 Wildtyp (pMX-STAT5) Konstrukt und ein mutiertes STAT5 Konstrukt (pMX-STAT5 1*6) genutzt, bei dem es durch 2 Punktmutationen zum Austausch von 2 Aminosäuren kommt und ein konstitutiv aktives STAT5 erzeugt wird [159]. Die Überexpression von STAT5 oder konstitutiv aktivem STAT5 (STAT5 1*6) allein, sowie die Co-Expression von NF- κ B (p65) und Wildtyp STAT5 führten nicht zu einer verstärkten Induktion des miR-155 Promotors (Abbildung 27). Im Vergleich dazu zeigt die Co-Expression von NF- κ B (p65) und konstitutiv aktivem STAT5 eine signifikante Erhöhung der miR-155 Promotoraktivität (Abbildung 27). Der dargestellte Effekt ist zwar sehr gering, kann jedoch mit der schlechten Transfektionseffizienz der großen STAT5 Vektoren erklärt werden. Die Beobachtungen werden auch durch verschiedene Publikationen gestützt, in denen gezeigt wurde, dass konstitutiv aktives STAT5 zu einer erhöhten DNA Bindeaffinität und zu einem gesteigerten Transaktivierungspotential von NF- κ B (p65) führt [138, 160-163]. Eine direkte Interaktion von STAT5 und NF- κ B (p65) konnte in der vorliegenden Arbeit, sowie in verschiedenen Publikationen nicht gezeigt werden [138, 162]. Dazu wie konstitutiv aktives STAT5 zu einer höheren DNA Bindeaffinität oder einem erhöhten Transaktivierungspotential von NF- κ B führt, ist bis jetzt nicht viel bekannt. Dies wäre deshalb eine interessante Fragestellung für eine weiterführende Untersuchung.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass NF- κ B (p65) durch die direkte Bindung am miR-155 die Expression der miR-155 induziert. Konstitutiv aktives STAT5 verstärkt die NF- κ B vermittelte miR-155 Expression (Abbildung 49).

4.2 Funktionelle Analysen der miR-155 in der FLT3-ITD assoziierten AML

Um die Funktion der miR-155 besser zu verstehen, wurde eine Expressionsanalyse in verschiedenen Mausknochenmark Subpopulationen durchgeführt. Es ist gut zu erkennen, dass mit steigendem Differenzierungsstatus der Zellen die Expression der miR-155 verringert wird (Abbildung 28). Diese Daten stimmen auch mit den Ergebnissen der miRNA Microarray Analysen überein, die ebenfalls eine Reduktion der miR-155 Expression während der MCSF induzierten myeloiden Differenzierung von humanen CD34⁺ Progenitorzellen zeigen (Tabelle 3). Zusätzlich konnte im Zelllinienmodell gezeigt werden, dass die PMA induzierte Monozyten / Makrophagen Differenzierung in U937 Zellen ebenfalls zu einer Reduktion der miR-155 Expression führt (Abbildung 29). Im Gegensatz dazu verringert die Überexpression der miR-155, die Differenzierungskapazität von PMA induzierten U937 Zellen (Abbildung 30). O'Connell et al. haben *in vivo* gezeigt, dass eine konstitutive Expression der miR-155 in hämatopoetischen Stammzellen zu einer myeloproliferativen Erkrankung führt [126, 164]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Überexpression der miR-155 in humanen CD34⁺ Zellen die Ausbildung von myeloiden und erythroiden Zellkolonien verhindert [110]. Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass die Repression der miR-155 Expression ein notwendiges Ereignis während der myeloiden Differenzierung ist.

Die Funktion von miRNAs ist die Regulation der Translation. Dazu wird die reife miRNA in den RISC (*RNA induced silencing complex*) geladen. Die Bindung der RISC gebundenen miRNA an die 3'UTR einer Ziel-mRNA führt zur Repression der Translation [75-76]. In *in silico* Analysen konnte PU.1 als putatives Ziel der miR-155 identifiziert werden. Die putative miR-155 Bindestelle in der PU.1 3'UTR ist hoch konserviert. Es ist bekannt, dass eine verminderte Expression von PU.1 eine Leukämie induziert [18] und zum Block der myeloiden Differenzierung führt [14, 17]. Weiterhin wurde gezeigt, dass PU.1 in der FLT3-ITD assoziierten AML reprimiert wird [50, 62]. Da bisher nicht erklärt wurde, wie PU.1 durch FLT3-ITD reprimiert wird, stellte sich die Frage ob die erhöhte miR-155 Expression zur Repression von PU.1 führt. Mittels Überexpression von FLT3-ITD bzw. miR-155 in U937 Zellen konnte eine verringerte Expression von PU.1 gezeigt werden (Abbildung 31). Im Gegensatz dazu zeigte der LNA vermittelte Block der miR-155,

in FLT3-ITD assoziierten MV4;11 Zellen, eine verstärkte PU.1 Expression (Abbildung 31). In Luziferaseassays wurde die direkte Bindung der miR-155 an der PU.1 3'UTR untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die miR-155 nur in der Wildtyp PU.1 3'UTR, jedoch nicht in einer PU.1 3'UTR mit mutierter miR-155 Bindestelle zur Reduktion der Luziferaseaktivität führt. Diese Ergebnisse werden von Arbeiten unterstützt in denen gezeigt wurde, dass PU.1 in dendritischen Zellen [113] sowie in B-Zellen [112] ein direktes Ziel der miR-155 ist. Weiterhin wurde in verschiedenen Arbeiten die inverse Korrelation zwischen PU.1 und der miR-155 Expression nachgewiesen [119, 158, 165]. Zusammenfassend belegen diese Daten, dass PU.1 in der FLT3-ITD assoziierten AML ein direktes Ziel der miR-155 ist.

In den weiteren Untersuchungen wurde die Relevanz der miR-155 für die FLT3-ITD induzierte Zelltransformation analysiert. Hier konnte gezeigt werden, dass der *Knockdown* der miR-155 in FLT3-ITD assoziierten AML-Zellen zu einem verminderten Koloniewachstum (Abbildung 33, Abbildung 34) und zu einer Reduktion der Proliferation führt (Abbildung 35). Der Einfluss der miR-155 auf die Proliferation von Tumorzellen wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bei verschiedenen malignen Erkrankungen, z. B. beim hepatozellulärem Karzinom [121], Mamakarzinom [122], Liposarkom [123], Glioblastom [124] sowie beim Larynxkarzinom [125] nachgewiesen. Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Block der miR-155 zu einer erhöhten Apoptose von FLT3-ITD assoziierten AML-Zellen führt (Abbildung 36). Babar et al. haben beim B-Zell-Lymphom ebenfalls nachgewiesen, dass ein miR-155 *Knockdown* eine erhöhte Zellmortalität bewirkt [116]. Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die Überexpression des miR-155 Ziels PU.1 eine erhöhte Apoptoserate bei FLT3-ITD positiven AML-Zellen auslöst (Abbildung 37). Dass PU.1 Apoptose in malignen Zellen induziert, wurde auch von weiteren Arbeitsgruppen publiziert [166-168]. Ueno et al. haben gezeigt, dass PU.1 durch die direkte Transaktivierung von TRAIL Apoptose in Myelom Zellen auslöst [167]. Es ist davon auszugehen, dass die in der Arbeit beschriebenen Einflüsse der miR-155 auf Proliferation und Apoptose nicht nur auf die Inhibition von PU.1 zurückzuführen sind. In zahlreichen Arbeiten wurden weitere Ziele der miR-155 publiziert, die ebenfalls einen Einfluss auf Proliferation und Apoptose haben. So

wurde gezeigt, dass die miR-155 vermittelte Suppression von SHIP1 bei der AML [134] und beim B-Zell-Lymphom [118] zur Verstärkung der Proliferation führt. Für das Mamakarzinom wurde beschrieben, dass die miR-155 die Proliferation und das Überleben von Tumorzellen durch den Block von FOXO3a erhöht [122]. Weiterhin wurde publiziert, dass der miR-155 verursachte Block von E2F2 beim Kolorektalkarzinom [135] bzw. BACH1 beim Nierenkarzinom [136] die Proliferation verstärkt. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Schwerpunkt auf die Untersuchung des FLT3-ITD/miR-155/PU.1 Netzwerkes gelegt wurde, kann hier keine Aussage zur Rolle von weiteren miR-155 Zielen in der FLT3-ITD assoziierten AML getroffen werden. Aktuell gibt es keine weiteren Publikationen zu miR-155 vermittelten Genregulation in der FLT3-ITD assoziierten AML.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse zu den regulatorischen und funktionellen Untersuchungen der miR-155 in der FLT3-ITD assoziierten AML, dass die Expression der miR-155 durch NF- κ B (p65) und STAT5, zwei FLT3-ITD aktivierten Zielen, induziert wird. NF- κ B (p65) bindet dabei direkt am Promotor der miR-155, während konstitutiv aktives STAT5 zu einer zusätzlichen transkriptionellen Induktion führt. Die erhöhte Expression der miR-155 bewirkt unter anderem die Suppression von PU.1, was eine erhöhte Proliferation und die Inhibition der myeloiden Differenzierung nach sich zieht. Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die miR-155 wichtig für die FLT3-ITD induzierte Proliferation ist und damit auch eine entscheidende Rolle in der FLT3-ITD angetriebenen Leukämogenese spielt (Abbildung 49).

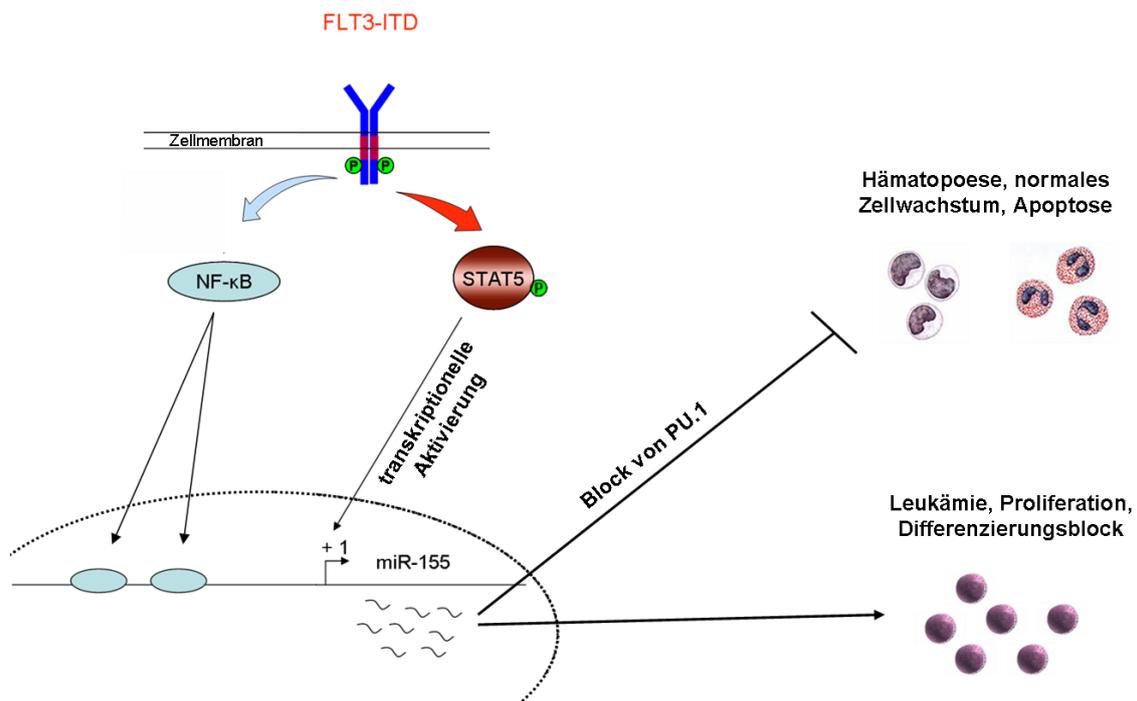


Abbildung 49: Modell: Ein NF-κB/STAT5/miR-155 Netzwerk supprimiert PU.1 in der FLT3-ITD angetriebenen Leukämie.

4.3 Block der miR-155 als therapeutischer Ansatz in der FLT3-ITD assoziierten AML

Für die FLT3-ITD [64] Mutation sowie für die miR-155 [132] konnte eine prognostische Relevanz in der AML nachgewiesen werden. Beide Faktoren sind mit einer schlechten Prognose assoziiert. Da der Block der miR-155 in Mäusen mit B-Zell-Lymphom die Proliferation von Tumorzellen sowie die Tumormasse selbst reduziert und Apoptose induziert [116, 120], wurde die miR-155 als therapeutisches Ziel in der FLT3-ITD assoziierten AML *in vivo* untersucht. Das verwendete Mausmodell wurde von Mizuki et al. zur Analyse von FLT3-ITD in der Leukämogenese etabliert [54]. Es handelt sich hierbei um ein methodisch einfaches System, da lediglich eine leukämische Zelllinie in syngene Mäuse appliziert wird. Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist, dass die Ausbildung der leukämischen Erkrankung lediglich 18 - 25 Tage dauert. Bei Transplantationsmodellen mit viraler FLT3-ITD Überexpression in Knochenmarkzellen beträgt die Latenzzeit für eine leukämische Erkrankung zwischen 70 - 120 Tage [57, 169-170]. Da die im Mausmodell genutzten 32D^{FLT3-ITD} Zellen ein humanes FLT3

exprimieren, konnte die Zunahme der Tumorzellen sehr einfach mittels anti-humanem FLT3 Antikörper durchflusszytometrisch untersucht werden. Die Ergebnisse der Mausmodell Etablierung (3.3.1) zeigen ein ähnliches Resultat wie die publizierten Daten von Mizuki et al. [54]. Die Mäuse verstarben innerhalb von 20 - 21 Tagen (Abbildung 38) an einer leukämischen Erkrankung und entwickelten eine Hepatosplenomegalie (Abbildung 40).

Der therapeutische Block der miR-155 in der FLT3-ITD assoziierten AML wurde bereits von zwei Gruppen analysiert [73, 158]. In beiden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der Block der miR-155 *in vivo* zu einem verlängerten Überleben der Versuchstiere geführt hat. Der Nachteil dieser Arbeiten ist jedoch, dass der Block der miR-155 durch die Inhibition von FLT3 bzw. NF- κ B induziert wurde. Da der Block von FLT3 bzw. NF- κ B gleich mehrere Signalwege inhibiert, können die publizierten Ergebnisse nicht nur auf den Block der miR-155 zurückgeführt werden. Daher sollte in dieser Arbeit gezeigt werden, ob der direkte Block der miR-155 durch LNAs zu einem verlängerten Überleben der Mäuse führen kann. Hierzu wurden die LNAs mittels Nukleofektion in die 32D^{FLT3-ITD} Zellen transfiziert. In vorherigen *in vitro* Versuchen konnten in Koloniewachstumsassays bereits deutliche Effekte des LNA vermittelten miR-155 Blocks nachgewiesen werden (Abbildung 33). In den *in vivo* Analysen zum LNA vermittelten miR-155 Block konnte kein Unterschied beim Überleben der Tiere festgestellt werden. Beide Gruppen (32D^{FLT3-ITD} scr bzw. 32D^{FLT3-ITD} LNA) verstarben nach 17 – 22 Tagen an einer leukämischen Erkrankung (Abbildung 41). Bei der Untersuchung der Akkumulation von Tumorzellen im peripheren Blut (Abbildung 42) sowie bei der Ausbildung der Hepatosplenomegalie (Abbildung 43) konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Durch die Betrachtung der Tumormasse in verschiedenen Geweben zum Todeszeitpunkt, konnte eine signifikant geringere Anzahl an LNA transfizierten 32D^{FLT3-ITD} Zellen im Knochenmark nachgewiesen werden (Abbildung 44). In der Leber konnte man tendenziell weniger Tumorzellen erkennen wenn die Zellen mit LNAs gegen die miR-155 transfiziert waren (Abbildung 44). In der Milz war kein Unterschied in der Anzahl der 32D^{FLT3-ITD} Zellen nachzuweisen (Abbildung 44). In verschiedenen Publikationen wurde bereits *in vivo* gezeigt, dass der Block der miR-155 zur Reduktion von Tumormasse oder zur geringern Proliferation von Tumorzellen führt [116, 120,

171-172]. Die Behandlung mit LNAs bzw. AntimiR-155 Oligonukleotiden erfolgt in diesen Publikationen systemisch und mehrmals. Die systemische Gabe von LNAs konnte aus Kostengründen nicht durchgeführt werden. Eine angestrebte Kooperation mit einer Firma die LNAs produziert, konnte während der Anfertigung der Arbeit nicht realisiert werden. Um dennoch einen effizienten und anhaltenden Block der miR-155 für die *in vivo* Analysen zu erzeugen, wurde die miR-155 in 32D^{FLT3-ITD} Zellen durch einen lentiviralen *Knockdown* mittels miRZip-System inhibiert. Der lentivirale *Knockdown* der miR-155 in 32D^{FLT3-ITD} Zellen führte in den *in vivo* Untersuchungen zu ähnlichen Ergebnissen wie der LNA vermittelte miR-155 Block. Die Tiere beider Gruppen bildeten nach 17 – 24 Tagen eine leukämische Erkrankung aus (Abbildung 45). Es konnte kein Unterschied beim Überleben der Tiere festgestellt werden. Alle Tiere entwickelten eine Hepatosplenomegalie (Abbildung 47). Die Blutanalysen zeigten eine leicht geringere Akkumulation von 32D^{FLT3-ITD} Zellen mit miR-155 Block im peripheren Blut am Tag 19 (Abbildung 46). Jedoch sind die Unterschiede nicht signifikant und aufgrund der geringen noch lebenden Tiere kann dieses Ergebnis lediglich als Tendenz gewertet werden. Interessanter Weise konnte bei der Analyse von Knochenmark, Milz und Leber gezeigt werden, dass eine geringere Akkumulation der 32D^{FLT3-ITD} Zellen vorlag, wenn sie mit miRZip-155 infiziert waren (Abbildung 48). Die Unterschiede der Zellakkumulation sind nicht signifikant, unterstützen allerdings die *in vivo* Ergebnisse des LNA vermittelten miR-155 Block (3.3.2). Schneider et al. haben im Mausexperiment gezeigt, dass die Überexpression der miR-155 zu einem besseren Anwachsen von transplantierten Knochenmark führt [173]. Dies könnte erklären, warum weniger Tumorzellen im Knochenmark gefunden wurden, wenn die miR-155 durch LNA oder miRZip-155 blockiert war. Bei der Nachbetrachtung der durchgeführten *in vivo* Experimente kann man die Anzahl der injizierten 32D^{FLT3-ITD} Zellen als sehr hoch bezeichnen. Die Injektion von 1×10^6 32D^{FLT3-ITD} Zellen führt in einer sehr kurzen Zeit zu einer aggressiven leukämischen Erkrankung. Durch eine Reduktion der injizierten leukämischen 32D^{FLT3-ITD} Zellen könnte man möglicherweise die bereits gezeigten Unterschiede in der Tumorzellakkumulation verstärken, bzw. ein verlängertes Überleben der Tiere mit miR-155 Block erreichen. Zusammenfassend weisen die Resultate der *in vivo* Experimente darauf hin, dass der Block der miR-155 in der FLT3-ITD

assoziierten AML durchaus therapeutisches Potential besitzt. Hierzu muss allerdings ein effizienter Block der miR-155 erreicht werden. Der Block der miR-155 durch eine kontinuierliche Behandlung mit therapeutischen LNAs könnte, wie bereits beim B-Zell-Lymphom gezeigt [120], zu einer deutlich reduzierten Proliferation von Tumorzellen im FLT3-ITD assoziierten AML Mausmodell führen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die miR-155 in der FLT3-ITD assoziierten AML durch die FLT3 induzierten Signalwege von STAT5 und NF- κ B reguliert wird. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass der Transkriptionsfaktor PU.1 ein direktes Ziel der miR-155 in der FLT3-ITD assoziierten AML ist. Eine hohe Expression der miR-155 führt zur erhöhten Proliferation während der Block der miR-155 in FLT3-ITD assoziierten AML Zellen Apoptose induziert. In den *in vivo* Untersuchungen konnten erste Hinweise dafür gefunden werden, dass miR-155 ein potenzielles therapeutisches Ziel in der FLT3-ITD assoziierten AML darstellen könnte.

5. Zusammenfassung

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine nicht kodierende RNAs, die durch translationelle Regulation viele biologische Prozesse steuern. In den letzten Jahren wurde der Einfluss von miRNAs auf die Hämatopoese und die Leukämogenese von vielen Arbeitsgruppen untersucht. Hierbei wurde gezeigt, dass eine erhöhte miR-155 Expression mit einer internen Tandemduplikation (ITD) in der Juxtamembrandomäne des FLT3 Rezeptors (FLT3) FLT3 korreliert. Ca. 30 % aller akuten myeloischen Leukämien (AML) sind mit der prognostisch ungünstigen FLT3-ITD Mutation und assoziiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Expression der miR-155 durch die FLT3-ITD induzierten NF- κ B und STAT5 Signalwege reguliert wird. So konnte nachgewiesen werden, dass NF- κ B (p65) durch die direkte Bindung am Promotor zur Induktion der miR-155 Expression führt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass konstitutiv aktives STAT5 zu einer erhöhten Aktivität des miR-155 Promotors führt.

In funktionellen Analysen konnte bewiesen werden, dass der myeloide Transkriptionsfaktor PU.1 ein direktes Ziel der miR-155 ist. Die Überexpression der miR-155 führt folglich zu einer Reduktion der myeloiden Differenzierung. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Block der miR-155 *in vitro* zur erhöhten Apoptose und einer geringeren Proliferation von FLT3-ITD assoziierten AML Zellen führt.

In *in vivo* Analysen wurde der Block der miR-155 als neuer therapeutischer Ansatz in der FLT3-ITD assoziierten AML untersucht. Hierbei konnte kein verlängertes Überleben der Versuchstiere nachgewiesen werden, jedoch zeigen die Ergebnisse eine reduzierte Akkumulation von leukämischen Zellen nach dem Block der miR-155.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die miR-155 ein wichtiger Faktor in der FLT3-ITD assoziierten AML ist und geben einen Hinweis darauf, dass die miR-155 ein neues potenzielles Ziel bei der AML Therapie darstellen könnte.

6. Referenzen

1. Rieger, M.A. and T. Schroeder, *Hematopoiesis*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. 4(12).
2. Benveniste, P., et al., *Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential*. Cell Stem Cell, 2010. 6(1): p. 48-58.
3. Kondo, M., I.L. Weissman, and K. Akashi, *Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow*. Cell, 1997. 91(5): p. 661-72.
4. Akashi, K., et al., *A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages*. Nature, 2000. 404(6774): p. 193-7.
5. de Bruin, A.M., C. Voermans, and M.A. Nolte, *Impact of interferon-gamma on hematopoiesis*. Blood, 2014. 124(16): p. 2479-86.
6. Civin, C.I., et al., *Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells*. J Immunol, 1984. 133(1): p. 157-65.
7. Baum, C.M., et al., *Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(7): p. 2804-8.
8. Egeland, T., et al., *Myeloid differentiation of purified CD34+ cells after stimulation with recombinant human granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (CSF), granulocyte-CSF, monocyte-CSF, and interleukin-3*. Blood, 1991. 78(12): p. 3192-9.
9. Orkin, S.H., *Transcription factors and hematopoietic development*. J Biol Chem, 1995. 270(10): p. 4955-8.
10. Gangenahalli, G.U., et al., *Stem cell fate specification: role of master regulatory switch transcription factor PU.1 in differential hematopoiesis*. Stem Cells Dev, 2005. 14(2): p. 140-52.
11. Ohneda, K. and M. Yamamoto, *Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage*. Acta Haematol, 2002. 108(4): p. 237-45.
12. Tenen, D.G., et al., *Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia*. Blood, 1997. 90(2): p. 489-519.
13. Cheng, T., et al., *Temporal mapping of gene expression levels during the differentiation of individual primary hematopoietic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(23): p. 13158-63.
14. Voso, M.T., et al., *Inhibition of hematopoiesis by competitive binding of transcription factor PU.1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(17): p. 7932-6.

15. Scott, E.W., et al., *Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages*. Science, 1994. 265(5178): p. 1573-7.
16. McKercher, S.R., et al., *Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities*. EMBO J, 1996. 15(20): p. 5647-58.
17. Rosenbauer, F., et al., *Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1*. Nat Genet, 2004. 36(6): p. 624-30.
18. Metcalf, D., et al., *Inactivation of PU.1 in adult mice leads to the development of myeloid leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(5): p. 1486-91.
19. *Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2013.*
20. Deschler, B. and M. Lubbert, *Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology*. Cancer, 2006. 107(9): p. 2099-107.
21. Bennett, J.M., et al., *Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group*. Ann Intern Med, 1985. 103(3): p. 460-2.
22. Schmoll, H.J., *Kompendium internistische Onkologie : Standards in Diagnostik und Therapie*. 4., völlig überarbeitete und erw. Aufl. ed. 2006, Heidelberg: Springer Medizin.
23. Bennett, J.M., et al., *Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group*. Ann Intern Med, 1985. 103(4): p. 620-5.
24. Harris, N.L., et al., *World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997*. J Clin Oncol, 1999. 17(12): p. 3835-49.
25. Berger, D.P., *Das rote Buch : Hämatologie und internistische Onkologie*. 2., überarbeitete und erw. Aufl. ed. 2002, Landsberg/Lech: Ecomed. xii, 1012 p.
26. Rosnet, O. and D. Birnbaum, *Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases*. Crit Rev Oncog, 1993. 4(6): p. 595-613.
27. Agnes, F., et al., *Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III*. Gene, 1994. 145(2): p. 283-8.
28. Rosnet, O., et al., *Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells*. Blood, 1993. 82(4): p. 1110-9.
29. Litzow, M.R., *More flitting about FLT3*. Blood, 2005. 106(10): p. 3331-3332.

30. Lisovsky, M., et al., *Flt3-ligand production by human bone marrow stromal cells*. Leukemia, 1996. 10(6): p. 1012-8.
31. Brasel, K., et al., *Expression of the flt3 receptor and its ligand on hematopoietic cells*. Leukemia, 1995. 9(7): p. 1212-8.
32. Hannum, C., et al., *Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs*. Nature, 1994. 368(6472): p. 643-8.
33. Lyman, S.D., et al., *Cloning of the human homologue of the murine flt3 ligand: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells*. Blood, 1994. 83(10): p. 2795-801.
34. Zhang, S. and H.E. Broxmeyer, *Flt3 ligand induces tyrosine phosphorylation of gab1 and gab2 and their association with shp-2, grb2, and PI3 kinase*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 277(1): p. 195-9.
35. Zhang, S. and H.E. Broxmeyer, *p85 subunit of PI3 kinase does not bind to human Flt3 receptor, but associates with SHP2, SHIP, and a tyrosine-phosphorylated 100-kDa protein in Flt3 ligand-stimulated hematopoietic cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. 254(2): p. 440-5.
36. Srinivasa, S.P. and P.D. Doshi, *Extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways cooperate in mediating cytokine-induced proliferation of a leukemic cell line*. Leukemia, 2002. 16(2): p. 244-53.
37. Zhang, S., C. Mantel, and H.E. Broxmeyer, *Flt3 signaling involves tyrosyl-phosphorylation of SHP-2 and SHIP and their association with Grb2 and Shc in Baf3/Flt3 cells*. J Leukoc Biol, 1999. 65(3): p. 372-80.
38. Zhang, S., et al., *Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling*. J Exp Med, 2000. 192(5): p. 719-28.
39. Turner, A.M., et al., *FLT3 receptor expression on the surface of normal and malignant human hematopoietic cells*. Blood, 1996. 88(9): p. 3383-90.
40. Takahashi, S., *Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications*. J Hematol Oncol, 2011. 4: p. 13.
41. Carow, C.E., et al., *Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias*. Blood, 1996. 87(3): p. 1089-96.
42. Birg, F., et al., *Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages*. Blood, 1992. 80(10): p. 2584-93.

43. Rosnet, O., et al., *Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells*. *Leukemia*, 1996. 10(2): p. 238-48.
44. Drexler, H.G., *Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells*. *Leukemia*, 1996. 10(4): p. 588-99.
45. Gilliland, D.G. and J.D. Griffin, *The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia*. *Blood*, 2002. 100(5): p. 1532-42.
46. Nakao, M., et al., *Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia*. *Leukemia*, 1996. 10(12): p. 1911-8.
47. Yamamoto, Y., et al., *Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies*. *Blood*, 2001. 97(8): p. 2434-9.
48. Abu-Duhier, F.M., et al., *Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia*. *Br J Haematol*, 2001. 113(4): p. 983-8.
49. Stirewalt, D.L. and J.P. Radich, *The role of FLT3 in haematopoietic malignancies*. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(9): p. 650-65.
50. Choudhary, C., et al., *AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations*. *Blood*, 2005. 106(1): p. 265-73.
51. Hayakawa, F., et al., *Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines*. *Oncogene*, 2000. 19(5): p. 624-31.
52. Tse, K.F., G. Mukherjee, and D. Small, *Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation*. *Leukemia*, 2000. 14(10): p. 1766-76.
53. Chalandon, Y. and J. Schwaller, *Targeting mutated protein tyrosine kinases and their signaling pathways in hematologic malignancies*. *Haematologica*, 2005. 90(7): p. 949-68.
54. Mizuki, M., et al., *Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways*. *Blood*, 2000. 96(12): p. 3907-14.
55. Choudhary, C., et al., *Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD*. *Blood*, 2007. 110(1): p. 370-4.
56. Spiekermann, K., et al., *Overexpression and constitutive activation of FLT3 induces STAT5 activation in primary acute myeloid leukemia blast cells*. *Clin Cancer Res*, 2003. 9(6): p. 2140-50.

57. Grundler, R., et al., *FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model*. Blood, 2005. 105(12): p. 4792-9.
58. Takahashi, S., et al., *Over-expression of Flt3 induces NF-kappaB pathway and increases the expression of IL-6*. Leuk Res, 2005. 29(8): p. 893-9.
59. Grosjean-Raillard, J., et al., *Flt3 receptor inhibition reduces constitutive NFkappaB activation in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia*. Apoptosis, 2008. 13(9): p. 1148-61.
60. Grandage, V.L., et al., *PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kappaB, Mapkinase and p53 pathways*. Leukemia, 2005. 19(4): p. 586-94.
61. Radomska, H.S., et al., *Block of C/EBP alpha function by phosphorylation in acute myeloid leukemia with FLT3 activating mutations*. J Exp Med, 2006. 203(2): p. 371-81.
62. Mizuki, M., et al., *Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations*. Blood, 2003. 101(8): p. 3164-73.
63. Frohling, S., et al., *Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm*. Blood, 2002. 100(13): p. 4372-80.
64. Bienz, M., et al., *Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype*. Clin Cancer Res, 2005. 11(4): p. 1416-24.
65. Thiede, C., et al., *Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis*. Blood, 2002. 99(12): p. 4326-35.
66. Zarrinkar, P.P., et al., *AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML)*. Blood, 2009. 114(14): p. 2984-92.
67. Weisberg, E., et al., *Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412*. Cancer Cell, 2002. 1(5): p. 433-43.
68. Yee, K.W., et al., *SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase*. Blood, 2002. 100(8): p. 2941-9.
69. Spiekermann, K., et al., *The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits FLT3 and induces growth arrest and apoptosis in AML-derived cell lines expressing a constitutively activated FLT3*. Blood, 2003. 101(4): p. 1494-504.

70. Levis, M., et al., *A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo*. Blood, 2002. 99(11): p. 3885-91.
71. Nelson, E.A., et al., *The STAT5 Inhibitor Pimozide Displays Efficacy in Models of Acute Myelogenous Leukemia Driven by FLT3 Mutations*. Genes Cancer, 2012. 3(7-8): p. 503-11.
72. Jing Zhang, L.L., Alan D. Friedman, Donald Small and Ido Paz-Priel, *Canonical NF- κ B Signalling Is a Potential Target in FLT3/ITD AML* in American Society of Hematology 2012: Atlanta.
73. Khalife, J., et al., *Pharmacological targeting of miR-155 via the NEDD8-activating enzyme inhibitor MLN4924 (Pevonedistat) in FLT3-ITD acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2015.
74. Zheng, R., A.D. Friedman, and D. Small, *Targeted inhibition of FLT3 overcomes the block to myeloid differentiation in 32Dcl3 cells caused by expression of FLT3/ITD mutations*. Blood, 2002. 100(12): p. 4154-61.
75. Ambros, V., *The functions of animal microRNAs*. Nature, 2004. 431(7006): p. 350-5.
76. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. 116(2): p. 281-97.
77. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. 75(5): p. 843-54.
78. Karp, X. and V. Ambros, *Developmental biology. Encountering microRNAs in cell fate signaling*. Science, 2005. 310(5752): p. 1288-9.
79. Cheng, A.M., et al., *Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis*. Nucleic Acids Res, 2005. 33(4): p. 1290-7.
80. Jordan, S.D., et al., *Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism*. Nat Cell Biol, 2011. 13(4): p. 434-46.
81. Calin, G.A., et al., *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, 2002. 99(24): p. 15524-9.
82. Calin, G.A., et al., *MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(32): p. 11755-60.
83. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature, 2005. 435(7043): p. 834-8.

84. Ghorai, A. and U. Ghosh, *miRNA gene counts in chromosomes vary widely in a species and biogenesis of miRNA largely depends on transcription or post-transcriptional processing of coding genes*. *Front Genet*, 2014. 5: p. 100.
85. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. *Science*, 2001. 294(5543): p. 853-8.
86. Mourelatos, Z., et al., *miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs*. *Genes Dev*, 2002. 16(6): p. 720-8.
87. Lee, Y., et al., *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. *EMBO J*, 2002. 21(17): p. 4663-70.
88. Rodriguez, A., et al., *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. *Genome Res*, 2004. 14(10A): p. 1902-10.
89. Baskerville, S. and D.P. Bartel, *Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes*. *RNA*, 2005. 11(3): p. 241-7.
90. Lau, N.C., et al., *An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans**. *Science*, 2001. 294(5543): p. 858-62.
91. Pulikkan, J.A., et al., *Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2010. 115(9): p. 1768-78.
92. Pulikkan, J.A., et al., *C/EBPalpha regulated microRNA-34a targets E2F3 during granulopoiesis and is down-regulated in AML with CEBPA mutations*. *Blood*, 2010. 116(25): p. 5638-49.
93. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. *EMBO J*, 2004. 23(20): p. 4051-60.
94. Hutvagner, G. and P.D. Zamore, *A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex*. *Science*, 2002. 297(5589): p. 2056-60.
95. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. *Cell*, 2009. 136(2): p. 215-33.
96. Shivdasani, R.A., *MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation*. *Blood*, 2006. 108(12): p. 3646-53.
97. Slack, F.J. and J.B. Weidhaas, *MicroRNA in cancer prognosis*. *N Engl J Med*, 2008. 359(25): p. 2720-2.
98. Fazi, F., et al., *A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis*. *Cell*, 2005. 123(5): p. 819-31.

99. Wang, X.S., et al., *MicroRNA-29a and microRNA-142-3p are regulators of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia*. Blood, 2012. 119(21): p. 4992-5004.
100. Chen, C.Z., et al., *MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation*. Science, 2004. 303(5654): p. 83-6.
101. Su, R., et al., *MiR-181 family: regulators of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia as well as potential therapeutic targets*. Oncogene, 2014. 0.
102. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of tissue-specific microRNAs from mouse*. Curr Biol, 2002. 12(9): p. 735-9.
103. Eis, P.S., et al., *Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(10): p. 3627-32.
104. Kluiver, J., et al., *BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas*. J Pathol, 2005. 207(2): p. 243-9.
105. Gatto, G., et al., *Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 trans-activates miR-155 transcription through the NF-kappaB pathway*. Nucleic Acids Res, 2008. 36(20): p. 6608-19.
106. Lu, F., et al., *Epstein-Barr virus-induced miR-155 attenuates NF-kappaB signaling and stabilizes latent virus persistence*. J Virol, 2008. 82(21): p. 10436-43.
107. Yin, Q., et al., *B-cell receptor activation induces BIC/miR-155 expression through a conserved AP-1 element*. J Biol Chem, 2008. 283(5): p. 2654-62.
108. Kopp, K.L., et al., *STAT5-mediated expression of oncogenic miR-155 in cutaneous T-cell lymphoma*. Cell Cycle, 2013. 12(12): p. 1939-47.
109. O'Connell, R.M., et al., *MicroRNAs enriched in hematopoietic stem cells differentially regulate long-term hematopoietic output*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(32): p. 14235-40.
110. Georgantas, R.W., 3rd, et al., *CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(8): p. 2750-5.
111. Rodriguez, A., et al., *Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function*. Science, 2007. 316(5824): p. 608-11.
112. Vigorito, E., et al., *microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells*. Immunity, 2007. 27(6): p. 847-59.
113. Martinez-Nunez, R.T., et al., *MicroRNA-155 modulates the pathogen binding ability of dendritic cells (DCs) by down-regulation of DC-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin (DC-SIGN)*. J Biol Chem, 2009. 284(24): p. 16334-42.

114. Ranganathan, P., et al., *Regulation of acute graft-versus-host disease by microRNA-155*. Blood, 2012. 119(20): p. 4786-97.
115. Itkin, T., et al., *Microrna-155 Promotes Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Mobilization and Proliferation*. Blood, 2012. 120(21).
116. Babar, I.A., et al., *Nanoparticle-based therapy in an in vivo microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. 109(26): p. E1695-704.
117. Costinean, S., et al., *Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase and CCAAT enhancer-binding protein beta are targeted by miR-155 in B cells of Emicro-MiR-155 transgenic mice*. Blood, 2009. 114(7): p. 1374-82.
118. Pedersen, I.M., et al., *Onco-miR-155 targets SHIP1 to promote TNFalpha-dependent growth of B cell lymphomas*. EMBO Mol Med, 2009. 1(5): p. 288-95.
119. Thompson, R.C., et al., *NF-kappaB down-regulates expression of the B-lymphoma marker CD10 through a miR-155/PU.1 pathway*. J Biol Chem, 2011. 286(3): p. 1675-82.
120. Zhang, Y., et al., *LNA-mediated anti-miR-155 silencing in low-grade B-cell lymphomas*. Blood, 2012. 120(8): p. 1678-86.
121. Xie, Q., et al., *Aberrant expression of microRNA 155 may accelerate cell proliferation by targeting sex-determining region Y box 6 in hepatocellular carcinoma*. Cancer, 2012. 118(9): p. 2431-42.
122. Kong, W., et al., *MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer*. J Biol Chem, 2010. 285(23): p. 17869-79.
123. Zhang, P., et al., *MiR-155 is a liposarcoma oncogene that targets casein kinase-1alpha and enhances beta-catenin signaling*. Cancer Res, 2012. 72(7): p. 1751-62.
124. Ling, N., et al., *microRNA-155 regulates cell proliferation and invasion by targeting FOXO3a in glioma*. Oncol Rep, 2013. 30(5): p. 2111-8.
125. Zhao, X.D., et al., *Overexpression of miR -155 promotes proliferation and invasion of human laryngeal squamous cell carcinoma via targeting SOCS1 and STAT3*. PLoS One, 2013. 8(2): p. e56395.
126. O'Connell, R.M., et al., *Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder*. J Exp Med, 2008. 205(3): p. 585-94.
127. Garzon, R., et al., *MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia*. Blood, 2008. 111(6): p. 3183-9.

128. Garzon, R., et al., *Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(10): p. 3945-50.
129. Jongen-Lavrencic, M., et al., *MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia*. Blood, 2008. 111(10): p. 5078-85.
130. Cammarata, G., et al., *Differential expression of specific microRNA and their targets in acute myeloid leukemia*. Am J Hematol, 2010. 85(5): p. 331-9.
131. Faraoni, I., et al., *MiR-424 and miR-155 deregulated expression in cytogenetically normal acute myeloid leukaemia: correlation with NPM1 and FLT3 mutation status*. J Hematol Oncol, 2012. 5: p. 26.
132. Marcucci, G., et al., *Clinical role of microRNAs in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: miR-155 upregulation independently identifies high-risk patients*. J Clin Oncol, 2013. 31(17): p. 2086-93.
133. Ferrajoli, A., et al., *Prognostic value of miR-155 in individuals with monoclonal B-cell lymphocytosis and patients with B chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2013. 122(11): p. 1891-9.
134. Xue, H., et al., *SHIP1 is targeted by miR-155 in acute myeloid leukemia*. Oncol Rep, 2014. 32(5): p. 2253-9.
135. Li, T., et al., *miR-155 regulates the proliferation and cell cycle of colorectal carcinoma cells by targeting E2F2*. Biotechnol Lett, 2014. 36(9): p. 1743-52.
136. Li, S., et al., *microRNA-155 silencing inhibits proliferation and migration and induces apoptosis by upregulating BACH1 in renal cancer cells*. Mol Med Rep, 2012. 5(4): p. 949-54.
137. Mueller, B.U., et al., *Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia*. Blood, 2002. 100(3): p. 998-1007.
138. Kawashima, T., et al., *STAT5 induces macrophage differentiation of M1 leukemia cells through activation of IL-6 production mediated by NF-kappaB p65*. J Immunol, 2001. 167(7): p. 3652-60.
139. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method*. Methods, 2001. 25(4): p. 402-8.
140. Braasch, D.A. and D.R. Corey, *Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA*. Chem Biol, 2001. 8(1): p. 1-7.

141. Crinelli, R., et al., *Locked nucleic acids (LNA): versatile tools for designing oligonucleotide decoys with high stability and affinity*. *Curr Drug Targets*, 2004. 5(8): p. 745-52.
142. Guzman, M.L., et al., *Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells*. *Blood*, 2001. 98(8): p. 2301-7.
143. Bueso-Ramos, C.E., et al., *Expression of constitutively active nuclear-kappa B RelA transcription factor in blasts of acute myeloid leukemia*. *Hum Pathol*, 2004. 35(2): p. 246-53.
144. Brandts, C.H., et al., *Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation*. *Cancer Res*, 2005. 65(21): p. 9643-50.
145. Fisher, R.C. and E.W. Scott, *Role of PU.1 in hematopoiesis*. *Stem Cells*, 1998. 16(1): p. 25-37.
146. Obad, S., et al., *Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs*. *Nat Genet*, 2011. 43(4): p. 371-8.
147. Thum, T., *MicroRNA therapeutics in cardiovascular medicine*. *EMBO Mol Med*, 2012. 4(1): p. 3-14.
148. Norman, K.L. and P. Sarnow, *Modulation of hepatitis C virus RNA abundance and the isoprenoid biosynthesis pathway by microRNA miR-122 involves distinct mechanisms*. *J Virol*, 2010. 84(1): p. 666-70.
149. Elmen, J., et al., *LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates*. *Nature*, 2008. 452(7189): p. 896-9.
150. Lee, E.J., et al., *Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer*. *Int J Cancer*, 2007. 120(5): p. 1046-54.
151. Wang, X., et al., *Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth*. *PLoS One*, 2008. 3(7): p. e2557.
152. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. *Cancer Res*, 2005. 65(16): p. 7065-70.
153. Nikiforova, M.N., et al., *MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. 93(5): p. 1600-8.
154. Schotte, D., R. Pieters, and M.L. Den Boer, *MicroRNAs in acute leukemia: from biological players to clinical contributors*. *Leukemia*, 2012. 26(1): p. 1-12.
155. Bunting, K.D., *STAT5 signaling in normal and pathologic hematopoiesis*. *Front Biosci*, 2007. 12: p. 2807-20.

156. Nosaka, T., et al., *STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells*. EMBO J, 1999. 18(17): p. 4754-65.
157. Baumgartner, B., et al., *Increased I κ B kinase activity is associated with activated NF- κ B in acute myeloid blasts*. Leukemia, 2002. 16(10): p. 2062-71.
158. Alachkar, H., et al., *Silvestrol exhibits significant in vivo and in vitro antileukemic activities and inhibits FLT3 and miR-155 expressions in acute myeloid leukemia*. J Hematol Oncol, 2013. 6: p. 21.
159. Onishi, M., et al., *Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell proliferation*. Mol Cell Biol, 1998. 18(7): p. 3871-9.
160. Scheeren, F.A., et al., *IL-21 is expressed in Hodgkin lymphoma and activates STAT5: evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis*. Blood, 2008. 111(9): p. 4706-15.
161. Nagy, Z.S., et al., *STAT5 regulation of BCL10 parallels constitutive NF κ B activation in lymphoid tumor cells*. Mol Cancer, 2009. 8: p. 67.
162. Nakamura, T., et al., *Cytokine receptor common beta subunit-mediated STAT5 activation confers NF- κ B activation in murine proB cell line Ba/F3 cells*. J Biol Chem, 2002. 277(8): p. 6254-65.
163. Nagy, Z.S., et al., *A preferential role for STAT5, not constitutively active STAT3, in promoting survival of a human lymphoid tumor*. J Immunol, 2006. 177(8): p. 5032-40.
164. O'Connell, R.M., et al., *Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(17): p. 7113-8.
165. Vargova, K., et al., *MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2011. 117(14): p. 3816-25.
166. Yuki, H., et al., *PU.1 is a potent tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma cells*. Blood, 2013. 121(6): p. 962-70.
167. Ueno, S., et al., *PU.1 induces apoptosis in myeloma cells through direct transactivation of TRAIL*. Oncogene, 2009. 28(46): p. 4116-25.
168. Yamada, T., et al., *Overexpression of PU.1 induces growth and differentiation inhibition and apoptotic cell death in murine erythroleukemia cells*. Blood, 1997. 89(4): p. 1383-93.
169. Kelly, L.M., et al., *FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model*. Blood, 2002. 99(1): p. 310-8.

-
170. Grundler, R., et al., *Dissection of PIM serine/threonine kinases in FLT3-ITD-induced leukemogenesis reveals PIM1 as regulator of CXCL12-CXCR4-mediated homing and migration*. J Exp Med, 2009. 206(9): p. 1957-70.
 171. Cheng, C.J., et al., *MicroRNA silencing for cancer therapy targeted to the tumour microenvironment*. Nature, 2015. 518(7537): p. 107-10.
 172. Butovsky, O., et al., *Targeting miR-155 restores abnormal microglia and attenuates disease in SOD1 mice*. Ann Neurol, 2015. 77(1): p. 75-99.
 173. Schneider, E., et al., *Hoxa9/Meis1 Mediate Leukemic Programming through MicroRNA-155*. Blood, 2014. 124(21).

7. Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Übersicht der Hämatopoese.....	2
Abbildung 2: Schematische Übersicht des FLT3 Rezeptors.....	7
Abbildung 3: Übersicht der FLT3 aktivierten Signalwege.	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung der miRNA Prozessierung.....	11
Abbildung 5: Durchflusszytometrische Analyse der aufgereinigten CD34 ⁺ Zellen	37
Abbildung 6: Die Expression des CD34 Oberflächenmarkers während der MCSF induzierten myeloiden Differenzierung	38
Abbildung 7: Expressionsanalyse des CD11b Oberflächenmarkers während der MCSF induzierten myeloiden Differenzierung	39
Abbildung 8: Die Expression des CD14 Oberflächenmarkers während der MCSF induzierten myeloiden Differenzierung	40
Abbildung 9: Expressionsanalyse des CD15 Oberflächenmarkers während der MCSF induzierten myeloiden Differenzierung	41
Abbildung 10: Morphologische Untersuchung der myeloiden Differenzierung.....	42
Abbildung 11: MicroRNA Expressionsprofil während der MCSF induzierten myeloiden Differenzierung von humanen CD34 ⁺ Progenitorzellen	43
Abbildung 12: Expressionsanalysen der miR-155 in AML-Patientenproben	46
Abbildung 13: Expressionsanalysen der miR-155 in Patientenproben in Abhängigkeit von verschiedenen prognostischen Faktoren.....	47
Abbildung 14: Expressionsanalyse der miR-155 in Patientenproben mit unterschiedlichem FLT3-Status.....	48
Abbildung 15: Die Überexpression von FLT3-ITD induziert die miR-155 Expression	49
Abbildung 16: FLT3-ITD induziert die miR-155 Expression.....	50
Abbildung 17: Der Block der FLT3-ITD Tyrosinkinaseaktivität inhibiert die miR-155 Expression.....	51
Abbildung 18: Die Inhibition von STAT5 reduziert die Expression der miR-155.....	52
Abbildung 19: Der siRNA-vermittelte <i>Knockdown</i> von STAT5 verringert die miR-155 Expression.....	53
Abbildung 20: Der <i>Knockout</i> von STAT5 im FLT3-ITD AML Mausmodell führt zur Reduktion der miR-155 Expression.....	54
Abbildung 21: Der siRNA vermittelte <i>Knockdown</i> von NF-κB (p65) führt zur Reduktion der miR-155 Expression.....	55

Abbildung 22: Der <i>Knockdown</i> von STAT5 und NF-κB verringern die FLT3-ITD vermittelte miR-155 Induktion.....	56
Abbildung 23: Schematische Übersicht der miR-155 Promotorregion.	57
Abbildung 24: Schematische Übersicht der miR-155 Promotor Luziferase Konstrukte.	57
Abbildung 25: Luziferaseassay zur Bestimmung der Promotoraktivität des miR-155 Promotor in MV4;11 Zellen.	58
Abbildung 26: NF-κB (p65) bindet FLT3-ITD abhängig am miR-155 Promotor.....	59
Abbildung 27: NF-κB (p65) und STAT5 1*6 induzieren die miR-155 Promotoraktivität.....	60
Abbildung 28: Die miR-155 Expression wird während der myeloiden Differenzierung herabreguliert	61
Abbildung 29: Die miR-155 Expression wird in der PMA induzierten myeloiden Differenzierung von U937 Zellen reprimiert.....	62
Abbildung 30: Die Überexpression der miR-155 reduziert die PMA induzierte myeloide Differenzierung von U937 Zellen.....	63
Abbildung 31: PU.1 ist eine putatives Ziel der miR-155.....	65
Abbildung 32: Die miR-155 bindet direkt an der PU.1 3'UTR	66
Abbildung 33: Der LNA vermittelte Block der miR-155 in 32D ^{FLT3-ITD} Zellen reduziert das Koloniewachstum.....	67
Abbildung 34: Der stabile <i>Knockdown</i> der miR-155 in 32D ^{FLT3-ITD} Zellen reduziert das Koloniewachstum.....	68
Abbildung 35: Der stabile <i>Knockdown</i> der miR-155 vermindert die Proliferation von 32D ^{FLT3-ITD} Zellen	69
Abbildung 36: Der Block der miR-155 induziert Apoptose in MV4;11 Zellen	70
Abbildung 37: Die Überexpression von PU.1 in FLT3-ITD assoziierten MV4;11 Zellen induziert Apoptose.	71
Abbildung 38: Die Injektion von FLT3 überexprimierenden 32D Zellen in C3H Mäuse, führt zur Induktion einer leukämischen Erkrankung.....	72
Abbildung 39: Akkumulation von FLT3 exprimierenden 32D Zellen im peripheren Blut von C3H Mäusen.....	73
Abbildung 40: Die Injektion von FLT3 überexprimierenden 32D Zellen führt zu einer Hepatosplenomegalie.	74
Abbildung 41: Überlebenskurven nach LNA-vermittelten miR-155 Block	75
Abbildung 42: Analyse der Zunahme von leukämischen Zellen im peripherem Blut von C3H Mäusen.....	76
Abbildung 43: Analyse von Milz und Leber nach LNA vermittelten miR-155 Block im 32D ^{FLT3-ITD} C3H Mausmodell.....	77

Abbildung 44: Analyse der Akkumulation von leukämischen 32D ^{FLT3-ITD} Zellen im Knochenmark, Milz und Leber von C3H Mäusen.	77
Abbildung 45: Überlebenskurven nach miRZip vermittelten miR-155 Block	79
Abbildung 46: Analyse der Zunahme von leukämischen Zellen im peripherem Blut von C3H Mäusen.....	80
Abbildung 47: Analyse von Milz und Leber nach miRZip-155 vermittelten Block der miR-155 im 32D ^{FLT3-ITD} C3H Mausmodell	80
Abbildung 48: Analyse der Akkumulation von leukämischen 32D ^{FLT3-ITD} Zellen im Knochenmark, Milz und Leber von C3H Mäusen	81
Abbildung 49: Modell: Ein NF-κB/STAT5/miR-155 Netzwerk supprimiert PU.1 in der FLT3-ITD angetriebenen Leukämie.....	89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: FAB-Klassifikation der AML.....	5
Tabelle 2: Charakteristika der verwendeten Patientenproben	24
Tabelle 3. Top 26 regulierte miRNAs am Tag 9, der MCSF induzierten myeloiden Differenzierung von humanen CD34 ⁺ Progenitorzellen.....	44

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Gerhard Behre für die Überlassung des interessanten Themas und die stetige Diskussionsbereitschaft sowie der vielseitigen Förderung meiner Arbeit.

Ebenso möchte ich Prof. Dr. Elmar Wahle für die Betreuung meiner Arbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I, der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, sowie für die Begutachtung der Dissertation danken.

Prof. Dr. Dr. Dietger Niederwieser und Prof. Dr. Carsten Müller-Tidow danke ich für die Bereitstellung von Patientenproben zur Analyse der miR-155 Expression.

Prof. Dr. Justus Duyster und Rebekka Dechow danke ich für die Kooperation und die Bereitstellung der STAT5 *Knockout* Mausmodell Proben.

Bei Dr. Vikas Madan bedanke ich mich für die Bereitstellung der sortierten murinen Knochenmark Subpopulationen.

Dr. Stefan Fricke, Nadja Hilger und Anne Marie Müller danke ich für ihre Kooperation und Unterstützung bei den *in vivo* Versuchen zum therapeutischen Block der miR-155 in der FLT3-ITD assoziierten AML.

Ganz besonders möchte ich mich bei Christiane, Daniela, Alex, Jenz und Carolina, meinen Kollegen in der AG Behre bedanken. Ihr standet mir stets mit Rat und Tat bei Seite, habt mit mir manche Diskussion ausgefochten und meist ein harmonisches und freundschaftliches Arbeitsklima verbreitet.

Außerdem möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeitern und Kollegen die mich begleitet haben für ihre Unterstützung bedanken.

Ich Danke meinen Freunden für alle Herausforderungen, bei denen man den Kopf frei kriegt.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meiner Frau Alice und meinen Kindern Til und Theo für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und gemeinsame Zeit bedanken.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Dennis Gerloff, 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. Diese Arbeit wurde von mir an keiner anderen wissenschaftlichen Institution vorgelegt.

Halle (Saale), 04.06.2015

Dennis Gerloff

Lebenslauf**Zur Person**

Name: Dennis Gerloff
Geburtsdatum: 15.01.1981
Geburtsort: Magdeburg
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder

Werdegang

09/87 - 07/91 Polytechnische Oberschule Diesterweg Magdeburg
09/91 - 06/95 Sekundarschule "Oskar Linke" Magdeburg
08/95 - 07/99 Gymnasium "Otto von Guericke" Magdeburg
Abitur 07/99
09/99 - 06/00 Wehrdienst: KfAusbZentrum Munster
10/00 - 01/06 Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Fachrichtung: Biologie
Schwerpunkt: Molekulare Biologie (Genetik, Pflanzenphysiologie)
01/06 Abschluss als Diplom Biologe
03/05 - 01/06 Diplomarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Institut für Genetik
Thema: „Zur Molekulargenetik von *lid*, einem putativen Regulator von Histonmodifikation und Gensilencing bei *Drosophila melanogaster*“
01/06 - 05/11 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Klinik für Innere Medizin, Universitätsklinikum Halle
05/11 - 07/15 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Universitätsklinikum Leipzig, Department für innere Medizin, Abteilung Hämatologie und Onkologie
10/08 - 06/15 Promotion zum Thema: „Regulatorische und funktionelle Untersuchungen der *miR-155* in der *FLT3-ITD* assoziierten akuten myeloischen Leukämie“

Stipendien

- 10/08 - 10/11 Stipendium der Deutschen Jose Carreras Leukämienstiftung e.V.
DJ 08/05: „Identifizierung und funktionelle Analyse von pathogenen Micro RNAs in der FLT3/ITD assoziierten AML“
- 11/11 - 04/12 Stipendium der DFG im Rahmen des GRK 1591
-

Halle (Saale), 04.06.2015

Dennis Gerloff

Publikationen

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. PMID: 23974200

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.** **2015** Mar;29(3):535-47. doi: 10.1038/leu.2014.231. Epub 2014 Aug 5. PMID: 25092144

Braeuer-Hartmann D, Hartmann J-U, Wurm AA, **Gerloff D**, Katzerke C, Verga Falzacappa M V, Pelicci PG, Mueller-Tidow C, Tenen DG, Niederwieser D and Behre G. PML/RAR. -regulated miR-181a/b cluster targets the tumor suppressor RASSF1A in Acute Promyelocytic Leukemia. **Cancer Research.** **2015** (May 29 accepted for publication)

Kongressteilnahmen

Vortrag DGHO 2010	“FLT3-ITD signaling induces oncogenic microRNA - 155 in acute myeloid leukaemia”
Poster ASH 2011	“FLT3-ITD signaling induces oncogenic miR-155 by NF- κ B and STAT5 pathways and thereby it targets PU.1”
Vortrag DGHO 2012	“FLT3-ITD signaling induces oncogenic miR-155 by NF- κ B and STAT5 pathways and thereby it targets PU.1”
Poster ASH 2012	“STAT5 and NF- κ B Induced Oncogenic miR-155 Directly Targets PU.1 in FLT3-ITD Associated AML”
Vortrag DGHO 2014	“NF- κ B/STAT5/miR-155 network targets PU.1 in FLT3-ITD-driven acute myeloid leukemia.”
Poster DGHO 2014	“microRNA-21 increases CSF1-R expression during PMA induced myeloid differentiation of U937 cells.”