

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
und dem Landeszentrum für Zell- und Gentherapie

(Direktor: Prof. Dr. med. Carsten Müller-Tidow)

MicroRNAs während der monozytären Differenzierung und Leukämie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Luisa Svenja Wiegboldt
geboren am 09.01.1984 in Berlin

Gutachterin / Gutachter:

- Prof. Dr. med. Carsten Müller-Tidow
- Apl. Prof. Dr. rer. nat., rer. medic. habil. Martin S. Staeger
- Prof. Dr. med. Gerhard Behre, Leipzig

26.01.2017

17.11.2017

Referat

Die Hämatopoese ist ein streng regulierter Prozess, in welchem pluripotente hämatopoetische Stammzellen verschiedene Differenzierungsstadien durchlaufen. Die zelltypspezifischen Differenzierungsschritte werden durch eine Kaskade verschiedener Transkriptionsfaktoren gesteuert. In den letzten Jahren sind zunehmend kleine, nicht-kodierende RNAs (microRNAs) ins Zentrum der Forschung gerückt. MicroRNAs sind in unterschiedliche biologische Prozesse involviert; sie regulieren die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von regulierten microRNAs während der Monopoese und die Analyse ihrer Regulationsmechanismen. Zunächst wurde die Zelllinie U-937 als monozytäres Differenzierungsmodell etabliert. Anschließend wurden Microarrayanalysen durchgeführt, um die microRNA Expressionsmuster während der monozytären Differenzierung zu untersuchen. Unter den hochregulierten microRNAs wurde insbesondere das microRNA-Cluster miR-221 / -222 weiter analysiert, da eine erhöhte Expression dieser microRNAs vor allem in soliden Karzinomen beschrieben wurde. Die Analyse der Grundexpression von miR-221 / -222 in verschiedenen, überwiegend hämatopoetischen Zelllinien zeigte eine erhöhte Expression von miR-221 in der FLT3-ITD assoziierten Zelllinie MV4-11 gegenüber nicht behandelten CD34⁺ Stammzellen. In den nachfolgenden Analysen konnte die Regulation des miR-221 / -222 Clusters über den FLT3-ITD-Signalweg nicht bestätigt werden.

Durch Sequenzanalysen konnte p27^{Kip1}, ein wichtiger Zellzyklusregulator, als potentiell Ziel des microRNA-Clusters miR-221 / -222 ermittelt werden. Die Ergebnisse gezielter LNA Knockdown Experimente festigten die Hypothese, dass p27^{Kip1} ein direktes Ziel von miR-221 / -222 in der Zelllinie MV4-11 ist.

Synopsis

Hematopoiesis is a strictly regulated process in which pluripotent hematopoietic stem cells run through various stages of differentiation. The cell-type specific steps of differentiation are being controlled by a cascade of different transcription factors. Within the last years, an increasing number of small, non-coding RNAs (microRNAs) placed themselves at the center of research. MicroRNAs are involved in various biological processes; they regulate the gene expression on a post-transcriptional level.

The aim of this thesis was the identification of regulated microRNAs during monopoiesis and the analysis of its regulatory mechanisms. At first, the cell line U-937 was established as a model for monocyte differentiation. Afterwards microarray analyses were performed to examine the microRNA expression profiles during the monocytes differentiation. Amongst the highly regulated microRNAs, especially the microRNA-cluster miR-221 / -222 was closely examined as an elevated expression of these microRNAs has been particularly described within solid carcinomas. The analysis of the basic expression of miR-221 / -222 in different, mostly hematopoietic cell lines showed an increased expression of miR-221 within the FLT3-ITD associated cell line MV4-11 compared to non-treated CD34⁺ stem cells. However, subsequent analysis could not verify the regulation of the miR-221 / -222 cluster via the FLT3-ITD signal transduction pathway.

With the help of sequential analyses, p27^{Kip1}, an important cell cycle regulator, could be determined as a potential target of the microRNA-Cluster miR-221 / -222. The results of selective LNA Knockdown experiments strengthened the hypothesis that p27^{Kip1} is a direct target of miR-221 / -222 in the cell line MV4-11.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	III
1. Einleitung.....	1
1.1. Hämatopoese.....	1
1.1.1. Stammzellen	1
1.1.2. Monozyten / Makrophagen	2
1.2. Leukämie	3
1.2.1. Einleitung	3
1.2.2. Akute myeloische Leukämie.....	3
1.2.3. Rezeptortyrosinkinase FLT3.....	5
1.3. MicroRNAs	5
1.3.1. Einleitung	5
1.3.2. MicroRNA Biogenese	6
1.3.3. MicroRNA Funktionsweise	7
1.3.4. MicroRNAs in der Hämatopoese	8
1.3.5. Das microRNA-Cluster miR-221 / -222.....	9
2. Zielstellung der Arbeit	11
3. Material und Methoden	12
3.1. Material	12
3.1.1. Chemikalien / Reagenzien.....	12
3.1.2. Antikörper und Sequenzen	13
3.1.3. Kits.....	14
3.1.4. Material und Reagenz für die Zellkultur	14
3.1.5. Gebrauchsmaterialien	15
3.1.6. Geräte	16
3.2. Methoden	17
3.2.1. Zellkultur	17
3.2.2. Durchflusszytometrische Analysen.....	18
3.2.3. Zellfärbungen nach Pappenheim.....	19
3.2.4. RNA-Isolation.....	19
3.2.5. Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	19
3.2.6. Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR).....	20
3.2.7. Microarrayanalysen	21
3.2.8. Nukleofektion mit Amaxa.....	22
3.2.9. LNA-Transfektion mit Lipofectamin Plus.....	22

3.2.10.	Gelelektrophorese von Proteinen	23
3.2.11.	Statistische Auswertungen	24
4.	Ergebnisse	25
4.1.	Die Zelllinie U-937 differenziert nach der Stimulation mit PMA zu Monozyten / Makrophagen	25
4.2.	PMA induziert eine spezifische microRNA Expression in der Zelllinie U-937	27
4.3.	Das microRNA-Cluster miR-221 / -222 zeigt eine zelllinienspezifische Expression.....	29
4.4.	Die Expression von miR-221 und miR-222 sinkt nach der Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren	31
4.5.	Die Überexpression von FLT3-ITD in U-937 Zellen führt nicht zur Induktion von miR-221 / -222	32
4.6.	P27 ^{Kip1} ist ein putatives Ziel von miR-221 / -222	33
4.7.	Der kombinierte LNA Knockdown von miR-221 + miR-222 erhöht das Proteinlevel von p27 ^{Kip1}	35
5.	Diskussion	37
5.1.	Hintergrund der Arbeit	37
5.2.	U-937 als Modell der monozytären Differenzierung	37
5.3.	Hochregulation von miR-221 und miR-222 während der Differenzierung zu Monozyten / Makrophagen	39
5.4.	Regulation von miR-221 / -222	41
5.5.	P27 ^{Kip1} ist ein Ziel von miR-221 / -222	43
5.6.	Perspektiven	44
6.	Zusammenfassung	46
	Literaturverzeichnis	47
	Thesen	54
	Anlagen (Tabellen)	55
	Selbstständigkeitserklärung.....	VI
	Erklärung über frühere Promotionsversuche	VII
	Lebenslauf	VIII
	Danksagung	IX

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
ATCC	American type culture collection
C, °C	Celsius, Grad Celsius
Ca.	Circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	Cluster of differentiation
CDK	Cyclin dependent kinase
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFU	Colony forming units
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
Ct	Cycle threshold
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
et al.	Und andere
FAB	French-American-British
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FBS	Foetal bovine serum
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3
g	Gravitation, Gramm
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierende-Faktor
h	Stunden
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Hydrochlorid
HSZ	Hämatopoetische Stammzellen
Inv.	Inversion
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's modified dulbecco's media

IV

ITD	Internal tandem duplication
L	Liter
LNA	Locked nucleic acid
M	Molar
MACS	Magnetic activated cell sorting
M-CSF	Monozyten-Kolonie-stimulierende-Faktor
M-CSFR	Monozyten-Kolonie-stimulierende-Faktor-Rezeptor
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
miRNA / miR / hsa-miR	MicroRNA / homo sapiens-microRNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mRNA	Messenger RNA
MW	Molekulargewicht, Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
nM	Nanomolar
ng	Nanogramm
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PE	Phycoerythrin
PIC	Protease inhibitor cocktail
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
PSG	Penicillin-Streptomycin-Glutamin
RISC	RNA induced silencing complex
PKI	Proteinkinaseinhibitor
qRT-PCR	Quantitative Realtime-Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rotations per minute
RT	Reverse Transkription

V

RTK	Rezeptortyrosinkinase
Rv	Reverse
SCF	Stem cell factor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
STABW	Standardabweichung
SYK	Spleentyrosinkinase
T	Translokation
Taq	Thermus aquaticus
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyl-Ethyldiamin
TNBC	Triple negative breast cancer
U	Units
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
Δ	Delta
μ l	Microliter
μ M	Micromolar

1. Einleitung

1.1. Hämatopoese

1.1.1. Stammzellen

Die Bildung von reifen Blutzellen wird als Hämatopoese bezeichnet. Es handelt sich um einen streng regulierten Prozess, welcher in der fetalen Leber, der Milz und dem Knochenmark stattfindet. Die Hämatopoese wird durch einen Pool von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) aufrechterhalten. Die HSZ durchlaufen während der Differenzierung verschiedene Stadien bis die Zellen endgültig ausdifferenziert sind. Ferner können die HSZ durch Zellteilung identische Nachkommen erzeugen. Sie besitzen somit die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Diese Fähigkeit nimmt jedoch mit zunehmender Differenzierung ab (Ogawa, 1993). Im ersten Abschnitt der Zelldifferenzierung können sich aus den HSZ myeloide oder lymphoide Vorläuferzellen entwickeln. Die weitere Entwicklung der myeloiden Vorläuferzellen führt zu Granulozyten- / Makrophagenvorläufern oder Megakaryozyten- / Erythrozytenvorläufern. Die Granulozyten- / Makrophagenvorläufer besitzen anschließend die Möglichkeit, sich zu Granulozyten-, Monozyten- oder Granulozyten- / Monozyten colony-forming-units (CFU) weiter zu differenzieren (Kondo et al., 1997; Akashi et al., 2000).

Transkriptionsfaktoren spielen eine entscheidende Rolle in der Ausbildung und Differenzierung von zelllinienspezifischen reifen Blutzellen. Abhängig von der Expression der Transkriptionsfaktoren und Dauer der Einwirkung können sich verschiedene Zellen ausbilden (Tenen et al., 1997). Manche Transkriptionsfaktoren können gegensätzliche Effekte auf verschiedene Vorläuferzellen haben (Iwasaki et al., 2006).

Während der Differenzierung bilden die Zellen unterschiedliche Oberflächenmarker aus. Der endgültige Phänotyp der Zellen wird durch diese zelltypspezifischen Oberflächenmarker charakterisiert (Ziegler et al., 1998). Die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern, gegen die verschiedenen Oberflächenantigene, erleichtert die phänotypische Charakterisierung der Zellen. Das als CD34 (Cluster of Differentiation) bekannte Antigen wird auf hämatopoetischen Stammzellen, verschiedenen Vorläuferzellen, Leukämiezellen, Endothelzellen und einigen fetalen mesenchymalen Zellen exprimiert. CD34 ist ein wichtiger immunologischer Marker zur Identifizierung dieser Zellen (Krause et al., 1994).

1.1.2. Monozyten / Makrophagen

Monozyten gehören dem humanen mononukleären Phagozytensystem an, das für die unspezifische Immunantwort gegen pathogene Organismen sowie zur Tumorüberwachung wichtig ist. Die im Blut zirkulierenden Monozyten stellen eine große heterogene Gruppe dar, die sich durch ihre Oberflächenmarker, ihre Phagozytosekapazität und ihr Differenzierungspotential unterscheiden. Sie werden nach ihrer Morphologie und Funktion in verschiedene Gruppen unterteilt. Die größte Untergruppe (> 80%) beinhaltet die klassischen Monozyten (CD14⁺ / CD16⁻). Diese werden durch ihre ausgeprägte Fähigkeit zur Zytokinproduktion, Antigenpräsentation, Phagozytose und Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen charakterisiert (Grage-Griebenow et al., 2001).

Auf spezifische Reize hin verlassen die Monozyten das Knochenmark und wandern durch periphere Blutgefäße, so erreichen sie unterschiedliche Gewebe. Dort differenzieren sie durch Wachstum, Vermehrung ihres lysosomalen Inhaltes, ihrer Menge an hydrolytischen Enzymen und ihrer Anzahl an Mitochondrien zu Makrophagen. Die spezifischen Funktionen der Makrophagen sind abhängig vom jeweiligen Gewebe (Valledor et al., 1998). Monozytenvorläuferzellen können sich nicht nur zu Makrophagen, sondern auch zu Osteoklasten und dendritischen Zellen weiterentwickeln (Roodman, 1996; Manz et al., 2001).

Die Granulozyten- / Makrophagenvorläufer zeigen eine charakteristische Expression von CD34 und des Fc γ -II/III-Rezeptors (Akashi, Traver et al., 2000; Traver, Miyamoto et al., 2001). Der Monozyten-Kolonie-stimulierende-Faktor-Rezeptor (M-CSFR), Lysozym, CD11b, CD18 und CD14 sind bekannte Oberflächenmarker zur Identifizierung von Monozyten / Makrophagen (Valledor et al., 1998).

Der Monozyten-Kolonie-stimulierende-Faktor (M-CSF) reguliert das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu monozytären Vorläufern und reifen Monozyten (Cecchini, Dominguez et al., 1994; Stanley, Berg et al. 1994). Darüber hinaus reguliert M-CSF Funktionen von Zellen des weiblichen Reproduktionstraktes und spielt eine wichtige Rolle bei der Fruchtbarkeit (Cohen et al., 1999). Sämtliche bekannte Funktionen von M-CSF werden durch den M-CSFR vermittelt (Guilbert und Stanley, 1980). Der M-CSFR wird von hämatopoetischen Stammzellen (Bartelmez et al., 1985), mononukleären Phagozytenvorläuferzellen (Tushinski et al., 1982), Monoblasten, Promonozyten, Monozyten (Guilbert und Stanley, 1980), Gewebemakrophagen (Byrne et al., 1981) und dendritischen Zellen (MacDonald et al., 2005) exprimiert. Bei dem Rezeptor handelt es sich um eine Tyrosinkinase, welche durch das c-fms proto-onkogen verschlüsselt wird (Yeung et al., 1987). Die monozytenspezifische Expression von c-fms wird unter anderem durch die

Transkriptionsfaktoren PU.1, AML1 (CBF α 2) und das CCAAT enhanced-binding Protein (C/EBP) reguliert, die mit dem c-fms Promoter interagieren (Zhang, Hetherington et al., 1996). Die Bindung von M-CSF an den M-CSFR führt zu einer Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors und anderer Proteine (Sengupta et al., 1988).

1.2. Leukämie

1.2.1. Einleitung

Leukämien sind Erkrankungen des blutbildenden Systems, die durch eine abnorme Proliferation von unreifen Blutzellen (Blasten) gekennzeichnet sind. Sie entstehen in einem mehrstufigen Prozess durch die maligne Transformation von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen, welche die Fähigkeit zur Differenzierung verloren haben und sich anschließend unkontrolliert vermehren (Appelbaum et al., 2001). Das Blutbild der Patienten zeigt eine Expansion und Akkumulation unreifer Vorläuferzellen. Die Verdrängung der normalen Hämatopoese führt zu Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie mit daraus resultierender Schwäche. Im Verlauf der Erkrankung kann es vermehrt zu bakteriellen Infektionen und einer erhöhten Blutungsneigung kommen. Eine Infiltration von extramedullären Organen ist möglich (Lowenberg et al., 1999).

Zu den häufigsten Leukämieformen gehören die akute myeloische Leukämie (AML), die akute lymphatische Leukämie (ALL), die chronische myeloische Leukämie (CML) und die chronische lymphatische Leukämie (CLL). Männer sind in der Regel häufiger betroffen als Frauen. Die ALL ist die häufigste Leukämieform im Kindesalter. Die Ätiologie der Leukämien ist bislang noch nicht abschließend geklärt. Bisher identifizierte, prädisponierende Risikofaktoren bei der Entstehung von Leukämien sind unter anderen ionisierende Strahlen, Zytostatika, mit einiger Wahrscheinlichkeit verschiedene Chemikalien sowie ein genetisch bedingtes Risiko, z.B. durch Trisomie 21 (Renz-Polster et al., 2004). Irreparable chromosomale Veränderungen, die für den Verlust wichtiger Genfunktionen und die Aktivierung von Onkogenen verantwortlich sind, können universell in fast allen Leukämiepatienten identifiziert werden (Croce, 2008).

1.2.2. Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie ist charakterisiert durch eine Ansammlung von myeloischen und myelomonozytischen Vorläuferzellen im Knochenmark und im peripheren Blut. Diese Zellen haben die Fähigkeit verloren sich weiter zu differenzieren. Die AML ist mit ca. 80% die häufigste Leukämieform im

Erwachsenenalter. Die Inzidenz liegt bei ca. drei Erkrankten pro 100.000 Einwohner pro Jahr und ist somit eher selten. Senioren (> 65 Jahre) haben eine höhere Inzidenz, diese liegt bei ca. 15 Erkrankten pro 100.000 Einwohner pro Jahr (Renz-Polster et al., 2004).

In Karyotypanalysen von Leukämiezellen konnten verschiedene chromosomale Veränderungen wie Translokationen, Inversionen und Deletionen nachgewiesen werden. Diese Abweichungen sind vielfach mit den verschiedenen Untergruppen der AML assoziiert (Look, 1997). Am Häufigsten sind die Translokationen t(15;17), t(8;21), t(11q23) und die Inversion inv(16), welche zusammen ca. 20% aller AMLs hervorrufen (Mitelman et al., 2007). Die chromosomalen Veränderungen dienen nicht nur der Klassifikation der AML, sondern können auch als prognostische Marker verwendet werden. Die Translokationen t(15;17) und t(8;21) sowie die Inversion inv(16) gehen mit einer besseren Prognose einher (Grimwade et al., 1998). Veränderungen auf den Chromosomen 5 und 7 sowie die Translokation t(11q23) gehen mit einer schlechteren Prognose einher (Schoch et al., 2005).

Die seit 1976 verwendete FAB-Klassifikation (French-American-British) gilt mit einigen Ergänzungen bis zum heutigen Tag als Standard bei der Diagnostik und Klassifikation der akuten myeloischen Leukämien und der myelodysplastischen Syndrome (MDS) (Bennett et al., 1976). Neben morphologischen, immunologischen und zytogenetischen Merkmalen werden zunehmend auch Immunphänotypisierungen und molekulargenetische Methoden verwendet. Seit einigen Jahren gewinnt die WHO-Klassifikation (World Health Organization) der AML und der MDS immer stärker an Bedeutung. Als generelle Festlegung gilt nach der WHO-Klassifikation, dass bei einem Blastenanteil von mehr als 20% im Knochenmark von einer AML zu sprechen ist (Haferlach und Schoch, 2002).

Tabelle 1: FAB-Klassifikation der AML.

In Anlehnung an: Basislehrbuch Innere Medizin, Seite 300 (Renz-Polster et al., 2004).

FAB-Subtyp	Häufigkeit	Beschreibung	Karyotyp
M0	3%	Minimal differenziert	inv(3q26) und t(3;3)
M1	20%	Myeloblastisch ohne Ausreifung	-
M2	25%	Myeloblastisch mit Ausreifung	t(8;21) und t(6;9)
M3	10%	Promyelozytär	t(15;17) und t(11;17)
M4	20%	Myelomonozytär	t(11q23), t(3;3) und inv(16)
M5	20%	Monozytär	t(11q23) und t(8;16)
M6	ca. 5%	Erythroleukämie	-
M7	ca. 5%	Megakaryoblastär	t(1;22)

1.2.3. Rezeptortyrosinkinase FLT3

Rezeptortyrosinkinasen (RTK) sind an die Zellmembran gebundene Rezeptoren mit zahlreichen Funktionen. Sie regulieren unter anderem den Zellzyklus, die Apoptose, die Differenzierung und die Migration von Zellen (Zwick et al., 2001). FLT3 (fms-like tyrosine kinase 3) gehört zur Untergruppe der Klasse III Rezeptortyrosinkinasen (RTK III), welche auch die c-Kit Rezeptortyrosinkinase (KIT) und den M-CSFR beinhaltet. FLT3 wird bevorzugt auf hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert und spielt eine entscheidende Rolle bei deren Wachstum, Differenzierung und Proliferation (Lyman und Jacobsen, 1998). Eine erhöhte Expression von FLT3 findet sich in leukämischen Blasten bei 70-90% der Patienten mit einer ALL oder AML (Carow, Levenstein et al., 1996; Rosnet, Buhning et al., 1996). Bis 2001 wurden knapp 60 Rezeptortyrosinkinasen entdeckt, mehr als 50% von ihnen sind an der Genese maligner Tumoren beteiligt (Blume-Jensen und Hunter, 2001).

FLT3-ITD-Mutationen (internal tandem duplication) treten häufig bei hämatologischen Erkrankungen auf. Sie finden sich in 20-30% der AML-Patienten (Nakao et al., 1996; Gilliland und Griffin, 2002) und gehen mit einer schlechteren Prognose einher (Iwai, Yokota et al., 1999). Die ITD-Mutation aktiviert die Tyrosinkinasedomäne des FLT3-Rezeptors. Dieser Vorgang induziert die Autophosphorylierung des Rezeptors und führt zu einer Aktivierung spezifischer Signalwege (Kiyoi et al., 1998).

1.3. MicroRNAs

1.3.1. Einleitung

MicroRNAs (miRNAs = miRs) sind kleine, phylogenetisch konservierte, nicht-kodierende RNAs, welche auf posttranskriptioneller Ebene eine Genrepression vermitteln. MicroRNAs wirken durch eine negative Regulation der Translation. Sie erkennen ihre Bindestellen, häufig in der 3' untranslatierten Region (UTRs) von Boten-RNAs (mRNAs), durch unvollständige Basenpaarung (Bartel, 2004). MicroRNAs sind in verschiedene biologische Prozesse, wie die Entwicklung (Karp und Ambros, 2005), die Differenzierung, die Proliferation (Cheng et al., 2005) und die Apoptose (Xu et al., 2004) involviert. Des Weiteren spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Etablierung, der Aufrechterhaltung und dem Ablauf der Hämatopoese sowie bei verschiedenen Krebserkrankungen (Chen et al., 2004). Viele microRNAs sind an genetischen Schwachstellen oder bekannten chromosomalen Bruchpunkten lokalisiert (Calin et al., 2004). Einige microRNAs kommen universell in allen Geweben und

Organen vor, während andere gewebe- oder organspezifisch sind (Calin und Croce, 2006; Esquela-Kerscher und Slack, 2006).

Die erste gefundene microRNA lin-4 wurde im Jahr 1993 von Victor Ambros und Kollegen in *Caenorhabditis elegans* entdeckt und spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des Wurms (Lee et al., 1993). Es wird angenommen, dass die Expression von ca. 30% der menschlichen Gene durch microRNAs reguliert werden (Lewis et al., 2005). Die miRBase (Version 20) registriert zurzeit ca. 30424 microRNAs in knapp 206 Arten (Kozomara und Griffiths-Jones, 2014).

1.3.2. MicroRNA Biogenese

Reife microRNAs sind einzelsträngige RNAs mit ca. 18-26 Nukleotiden, welche eine 5`-Phosphat und eine 3`-Hydroxylgruppe besitzen. Initial werden microRNAs durch die RNA Polymerase Typ II zu langen Vorläufer-miRNAs (primary oder pri-miRNAs) transkribiert, die typische Haarnadelstrukturen (stemloops) mit 60-80 Basen bilden (Lee, Kim et al., 2004). Diese werden innerhalb des Nukleus von der RNase III „Drosha“ und dem Doppelstrang-RNA bindenden Protein „Pasha“ zu 70-80 Nukleotide langen pre-miRNAs (precursor miRNAs) prozessiert (Lee et al., 2003). Mit Hilfe von RAN-GTP und dem Exportrezeptor Exportin-5 werden die pre-miRNAs aktiv aus dem Nukleus ins Zytoplasma transportiert (Yi et al., 2003). Im Zytoplasma werden die pre-miRNAs durch die RNase III „Dicer“ zu reifen, aber noch doppelsträngigen miRNAs prozessiert (Hutvagner, McLachlan et al., 2001). Lediglich der funktionale Strang der doppelsträngigen miRNA wird in den so genannten RNA-induced silencing complex (RISC) aufgenommen. Dieser selektive Ladeprozess wird durch die Stabilität der Enden des Duplex bestimmt. Bei dem aufgenommenen Strang handelt es sich immer um denjenigen Strang, der nur lose an das 5`-Ende gebunden ist. Der nicht aufgenommene Strang wird durch den zelleigenen Entsorgungsapparat abgebaut (Schwarz, Hutvagner et al., 2003).

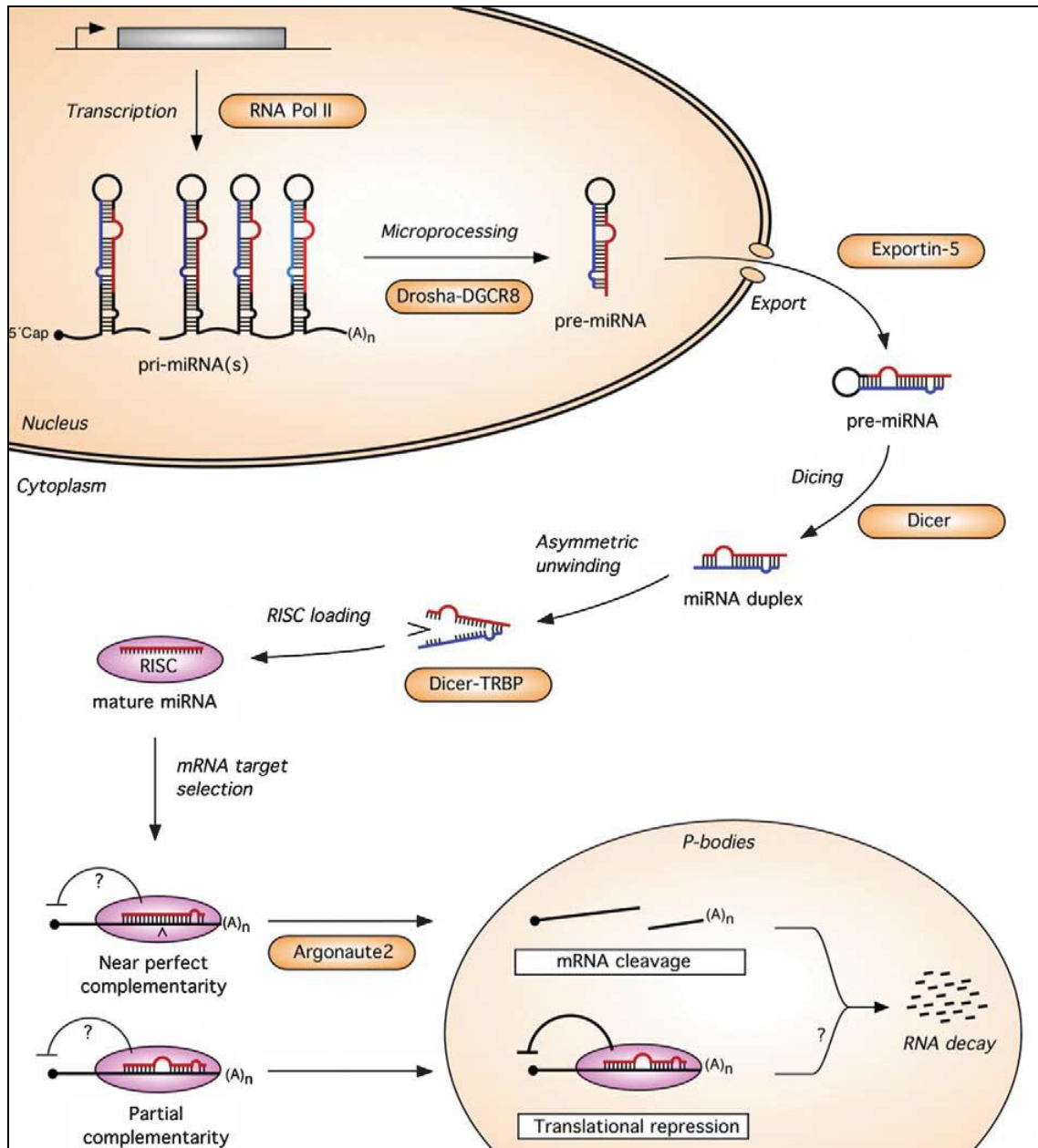


Abbildung 1: Schematisches Modell der microRNA Biogenese im Menschen.

Dargestellt sind die verschiedenen Abschnitte der microRNA Prozessierung (Wienholds und Plasterk, 2005).

1.3.3. MicroRNA Funktionsweise

Reife microRNAs erkennen ihre Ziel-mRNA durch die Basenpaarung einer kurzen Sequenz von 2-8 Nukleotiden, in der sogenannten „seed-Region“ der microRNA, mit den komplementären Nukleotiden in der 3' UTR der mRNA (Lewis et al., 2003). MicroRNAs können ihre Ziele durch zwei unterschiedliche posttranskriptionelle Mechanismen regulieren: Durch die Blockierung der Translation oder den direkten Abbau der Ziel-mRNA. Die beiden Regulationsmechanismen sind abhängig vom Grad der Komplementarität zwischen den Nukleotiden der microRNA und der mRNA. Eine geringe Komplementarität zwischen microRNA und mRNA führt zur Blockierung der

Translation. Wohingegen eine vollständige bzw. nahezu vollständige Komplementarität in einer Teilung der mRNA resultiert. Anschließend kommt es zum Zerfall der Ziel-RNA (Hutvagner und Zamore, 2002).

Eine unvollständige oder anteilige Komplementarität zwischen microRNA und ihrer Ziel-mRNA reicht für eine Interaktion aus. So kann eine einzelne microRNA theoretisch eine sehr große Anzahl an Zielen regulieren. Im Umkehrschluss kann jedoch eine mRNA auch durch verschiedene microRNAs reguliert werden, da ein einzelnes Gen mehrere microRNA Bindestellen in der 3`UTR aufweisen kann (Shivdasani, 2006). Bis heute bleibt die genaue Identifizierung der microRNAs und ihrer Ziele ein wichtiger Forschungsschwerpunkt.

1.3.4. MicroRNAs in der Hämatopoese

Zwischen normalen Zellen und leukämischen Zellen zeigen sich unterschiedliche microRNA Expressionslevel. Dieser Unterschied deutet auf eine Funktion der microRNAs während der Hämatopoese und möglicherweise auch bei der malignen Transformation hin (Ramkissoon et al., 2006). Die biologische Relevanz der microRNAs während der Hämatopoese wurde durch die Identifizierung von drei hämatopoesespezifischen microRNAs bei Mäusen gezeigt. Ihre Expression unterliegt in der frühen Hämatopoese und in der zelllinienspezifischen Differenzierung einer speziellen Regulation. Die miR-181 wird bevorzugt bei Zellen der B-Zelllinie gefunden. Die ektope Expression von miR-181 in hämatopoetischen Stamm- / Vorläuferzellen führt zu einer Verdopplung der B-Zelllymphozyten in Gewebekulturen und auch im peripheren Blut (Chen et al., 2004). Die miR-142 findet sich vor allem in B-Zell-Vorläufern und myeloiden Vorläufern, während die miR-223 gehäuft in der myeloiden Linie des Knochenmarks zu finden ist. Die ektope Expression von miR-142 bzw. miR-223 führt jedoch zu einer 30-40%igen Erhöhung der T-Lymphozyten (Chen et al., 2004).

Die beiden microRNAs miR-15a und miR-16-1 bilden einen Cluster, welches auf dem Chromosom 13q14 liegt. Die hemi- oder homozygote Deletion dieser Region findet sich gehäuft bei chronisch lymphatischen Leukämien. In ca. 65% der CLL-Fälle mit einer hemi- oder homozygoten Deletion von 13q14 sind diese beiden microRNAs entfernt oder herunterreguliert (Calin, Dumitru et al., 2002).

Ein weiteres Beispiel für die Relevanz von microRNAs während der Hämatopoese ist die miR-155, welche als erstes humanes microRNA-Onkogen beschrieben wurde (Metzler et al., 2004). Die miR-155 kann in verschiedenen Lymphomen der B-Zellreihe in unterschiedlichen Entwicklungsstadien nachgewiesen werden. Erhöhte Werte wurden sowohl in aggressiven diffusen großzelligen B-Zell-

Lymphomen, in weniger aggressiven chronischen lymphatischen Leukämien, als auch in Non-Hodgkin-Lymphomen und Hodgkin-Lymphomen gefunden (Eis et al., 2005). Diese microRNA hat mehrere mögliche Ziele, die mit der Hämatopoese in Verbindung stehen. Eine Transduktion von miR-155 in gesunde CD34⁺ Zellen führt zu einer negativen Regulation der Myelopoese und der Erythropoese (Georgantas et al., 2007).

1.3.5. Das microRNA-Cluster miR-221 / -222

Ein besonderer Fokus dieser Arbeit liegt auf den beiden microRNAs miR-221 und miR-222, welche bereits in unterschiedlichen malignen Erkrankungen nachgewiesen wurden. Eine erhöhte Expression von miR-221 und miR-222 wurde unter anderem beim Prostatakarzinom (Galardi, Mercatelli et al., 2007), Glioblastom (Ciafrè et al., 2005; le Sage et al., 2007), Melanom (Felicetti et al., 2008) sowie papillärem Schilddrüsenkarzinom (Visone et al., 2007) beschrieben. In TNBC-Zelllinien (triple negative breast cancer) konnte ebenfalls eine Hochregulation von miR-221 nachgewiesen werden (Nassirpour et al., 2013). Verglichen mit gesundem Knochenmark und CD34⁺ Stammzellen zeigen AML-Patientenproben eine erhöhte Expression von miR-221 und miR-222 (Dixon-McIver, East et al., 2008; Isken, Steffen et al., 2008). Cai und Kollegen konnten eine erhöhte Expression von miR-221 bei Patienten mit einem Kolonkarzinom als Marker für eine schlechtere Prognose und ein vermindertes Überleben identifizieren (Cai et al., 2015).

Die beiden microRNAs gehören einem Gencluster mit identischen Bindesequenzen an. Sie liegen auf dem X-Chromosom (Xp11.3) und sind lediglich durch 727 Nukleotide voneinander getrennt (Tabasi und Erson, 2008). Mit Hilfe der Algorithmen frei verfügbarer Datenbanken finden sich aktuell knapp 446 potentielle Ziele von miR-221 und miR-222 (www.targetscan.org, Version 6.2). Einige bereits bestätigte Ziele von beiden microRNAs in soliden Tumoren und der Erythropoese sind p27^{Kip1}, p57^{Kip2} (Medina et al., 2008) und c-Kit (Felli, Fontana et al., 2005). Die Aufgaben und Funktionsweise von miR-221 / -222 innerhalb der myeloischen Leukämien und der Monopoese sind noch weitgehend unerforscht. Auch eine Bestätigung möglicher Ziele von miR-221 / -222 im myeloiden System und in Leukämien stehen noch aus.

P27^{Kip1} (= CDKN1B) repräsentiert einen wichtigen Zellzyklusregulator. Es handelt sich bei diesem, zusammen mit p21^{Cip1} und p57^{Kip2}, um ein Mitglied der Cip/Kip Familie von cyclin-abhängigen Kinase (CDK) Inhibitoren, welche negativ auf den Zellzyklus wirken. Das kodierte Protein bindet am Cyclin E-CDK2 oder Cyclin D-CDK4 Komplex und verhindert dessen Aktivierung. Es kontrolliert den Zellzyklusprogress von der G1-Phase in die S-Phase und moduliert so Zellüberleben und Apoptose (Sherr und

Roberts, 1999). Durch diese Zellzykluskontrolle wird p27^{Kip1} als Tumorsuppressor charakterisiert. Im Umkehrschluss findet sich in verschiedenen malignen Erkrankungen eine reduzierte oder nicht vorhandene Expression von p27^{Kip1} in Verbindung mit einer schlechten Prognose (Tsihlias et al., 1999).

MiR-221 und miR-222 sind wirkungsvolle Inhibitoren der p27^{Kip1} Expression. Durch eine p27^{Kip1} spezifische Hemmung konnte gezeigt werden, dass die meisten Effekte von miR-221 / -222 auf den Zellzyklus durch dieses Protein gesteuert werden (Felicetti et al., 2008). Wird die miR-221 überexprimiert, zeigt sich, dass die Zellen die G1-Phase überwinden und sich in die S-Phase begeben. Gleichzeitig zeigt sich eine signifikante Runterregulation des p27^{Kip1} Proteinlevels im papillärem Schilddrüsenkarzinom (Visone et al., 2007).

Die Tyrosinkinase c-Kit (= KIT) ist ein weiteres Ziel von miR-221 und miR-222. C-Kit spielt eine entscheidende Rolle in der frühen Hämatopoese und der erythropoetischen Differenzierung. MiR-221 und miR-222 hemmen die normale Erythropoese und das erythroleukämische Zellwachstum mittels der Herunterregulation des KIT-Rezeptors. Funktionelle Studien zeigen eine inverse Korrelation von c-Kit und der miR-221 / -222 Expression sowohl während der erythrozytären Differenzierung (Felli et al., 2005) als auch während der Melanomprogression (Felicetti et al., 2008).

2. Zielstellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Expression spezifischer microRNAs während der monozytären Differenzierung zu untersuchen. Des Weiteren sollten die Ziele und die Regulationsmechanismen der identifizierten microRNAs betrachtet werden. Zunächst wurden Differenzierungsexperimente mit der Zelllinie U-937 nach der Stimulation mit PMA durchgeführt. Anschließend wurde die differenzielle Expression der microRNAs während der monozytären Differenzierung mit Hilfe von Microarrays und quantitativen Realtime-PCRs analysiert.

Ein spezielles Interesse dieser Arbeit galt der Expression und Regulation des microRNA-Clusters miR-221 / -222. Es wurden funktionelle Experimente mit Proteinkinaseinhibitoren und Rezeptortyrosinkinasen durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Expression von miR-221 und miR-222 durch FLT3-ITD induziert wird. Weiterführend sollte das Verhältnis von miR-221 / -222 zu p27^{Kip1} in verschiedenen Zellen / Zelllinien näher analysiert werden. Ferner wurden Versuche zum Nachweis der biologischen Funktion mittels microRNA Knockdowns durch spezifische LNA durchgeführt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien / Reagenzien

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
2-Propanol 99,8%	Roth
Accutase	PAA
Agarose GTQ	Roth
Ammoniumpersulfat > 98% (APS)	Sigma
Aqua destillat (Aqua dest.)	Braun
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid > 94% (CaCl ₂)	Roth
Desoxycholat	Sigma
Desoxyribonuklease I (DNAse I)	Sigma- Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen
DNA ladder mix (Gene Ruler)	Fermentas
EDTA, Dinatriumsalz Dihydrat > 99%	Roth
Essigsäure 100%	Roth
Ethanol 99,8%	Roth
Ethidiumbromidlösung 1%	Roth
FACS Clean	Becton Dickinson
FACS Flow	Becton Dickinson
FACS Rinse	Becton Dickinson
Glycerol > 99,5%	Roth
Igepal	Sigma- Aldrich
Lipofectamin reagent (2 mg/ml)	Invitrogen
Luminol	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Fluka
May-Grünwald Farbstoff	Sigma- Aldrich
Methanol	Roth
Milchpulver (Blotting grade)	Roth
Natriumchlorid 99,8% (NaCl)	Roth
PageRuler prestained protein ladder	Fermentas
Para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)	Fluka

Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich
Protein assay reagent	Bio-Rad
PLUS reagent (3 mg/ml)	Invitrogen
Protease inhibitor cocktail (PIC)	Sigma
Rotiphorese Gel 30	Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS) ultra pure > 99%	Roth
SDS-Page 10x Rotiphorese	Roth
Siglo Red	Thermo Scientific Dharmacon
Sodium citrate (Natriumcitrat)	Sigma
TaqMan Micro-RNA Assay (hsa-miR-221, hsa-miR-222, RNU6B)	Applied Biosystems
TaqMan 2x Universal PCR master mix	Applied Biosystems
TEMED (N,N,N,N'-Tetramethyl-Ethylendiamin)	Bio-Rad
Trichlormethan / Chloroform 99%	Roth
Tris Ultra Qualität 99,9%	Roth
Tris-HCl (Hydrochlorid) > 99%	Roth
TRIzol-Reagent	Invitrogen
Tween20	Bio-Rad
Wasser für die Molekularbiologie (DEPC-behandelt)	Roth
Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂)	Merck
WRIGHT-Giemsa Farbstoff (modifiziert)	Sigma-Aldrich

3.1.2. Antikörper und Sequenzen

Facs-Antikörper

CD34 PE (Phycoerythrin)
 CD11b/Mac-1 PE
 IgG1, κ PE Isotyp Kontrolle

Becton Dickinson

Western-Blot-Antikörper

Anti-GAPDH
 Anti-p27 [Kip1]
 Anti-STAT5
 Anti-phospho-STAT5 (STAT5p)
 Goat-anti-mouse IgG-HRP
 Goat-anti-rabbit IgG-HRP

Santa Cruz Biotechnology
 Becton Dickinson
 Santa Cruz Biotechnology
 Cell Signaling
 Santa Cruz Biotechnology
 Santa Cruz Biotechnology

PCR-Primer

Tabelle 2: PCR-Primer Sequenzen. Die PCR-Primer wurden von Biomers bezogen.

Primer	Nukeotidsequenz	Temperatur	Ursprung
β-Actin	Fw.: 5`-gga ctt cga gca aga gat gg-3`	51°C	human
	Rv.: 5`-agc act gtg ttg gcg tac ag-3`		
M-CSFR	Fw.: 5`-gtg gct gtg aag atg ctg aa-3`	51°C	human
	Rv.: 5`-cct tcc ttc gca gaa agt tg-3`		

3.1.3. Kits

Cell Line Nucleofector Kit V	Amaxa
Direct CD34 progenitor cell isolation kit, human (10e10) Macs Reagents	Miltenyi Biotec
High-Capacity cDNA reverse Transcriptions Kit	Applied Biosystems
ImProm II RT-System	Promega
MiRCURY LNA microRNA Array kit	Exiqon
MiRCURY LNA microRNA Array labeling kit	Exiqon
MiRCURY LNA microRNA Array Spike-in miRNA kit	Exiqon

3.1.4. Material und Reagenz für die Zellkultur

Stammzellen

Von der Universitätsklinik Halle-Saale zur Verfügung gestellte Leukapherisate von gesunden Spendern und Spendern ohne Knochenmarkserkrankung dienen der Isolation von CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen. Die Studienprotokolle wurden von der Ethikkommission genehmigt. Schriftliche Einverständniserklärungen der Patienten liegen vor.

Zelllinien

Tabelle 3: Zelllinien. Die Zelllinien wurden von ATCC bezogen.

Zelllinie	Zelltyp	Besonderheit
HL-60	Humane akute myeloische Leukämie	
K-562	Humane chronische myeloische Leukämie in Blastenkrise	
MV4-11	Humane akute monozytäre Leukämie	FLT3-ITD-Mutation
PC-3	Humanes Prostatakarzinom	
U-937	Humanes histiozytäres Lymphom	

Zellkulturmedien und Zusätze

Foetal bovine serum (FBS)	PAA
Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM)	Bio Wittaker
Opti MEM I	Gibco
Phosphate buffered saline (PBS) 10x pH=7,2	Gibco
Penicillin-Streptomycin-Glutamine (PSG)	Gibco
rHu IL-6	PAN BIOTECH
rH-FLT3	Immunotools
rHu SCF	PAN BIOTECH
RPMI 1640	PAA
Einfrier-Medium:	90% FBS, 10% DMSO
IMDM-Medium:	10% FBS, 1% PSG, 0,05 ng/µl SCF, 0,05 ng/µl FLT3, 0,05 ng/µl IL-6
RPMI-Medium:	10% FBS, 1% PSG

RTK Inhibitoren

SU5614	CALBIOCHEM
PKC412	Novartis

Plasmide

FLT3-ITD	Arbeitsgruppe C. Thiede
FLT3-WT	Arbeitsgruppe C. Thiede

MiRCURY Locked Nucleic Acid (LNA) Knockdown

hsa-miR-221 (25 µM)	Exiqon
hsa-miR-222 (25 µM)	Exiqon
miR-scramble (199002-00) (25 µM)	Exiqon

3.1.5. Gebrauchsmaterialien

CellTrics-Filter	Partec
Deckglas (Lifter Slip)	Exiqon
Facs-Röhrchen	Becton Dickinson
Hyperfilm ECL	Amersham
Kryoröhrchen (1,5 ml)	Techno Plastic Products AG (TPP AG)
Macs LS+Säulen	Miltenyi Biotec
MiRCURY LNA microRNA V8.1 Microarrays	Exiqon

Neubauer-Zählkammer + Deckgläser	Fuchs-Rosenthal
Nitrocellulose Filter	Millipore
Optically clear sealing film	Bio-Rad
Pasteurpipetten	Roth
PCR Plate (96 Well)	Bio-Rad
Serologische Pipetten (5, 10, 25, 50 ml)	TPP AG
SuperFrost (Zytospingläser)	Menzel-Gläser
Spritzenfilter (0,20 µm)	TPP AG
UVette	Eppendorf
Whatman Membran Gel-Blotting-Papier	Roth
Zellkultur Testplatte (6, 12, 24 Well)	TPP AG
Zellkulturflaschen (25, 75, 150 cm ²)	TPP AG
Zellschaber (24 cm)	TPP AG
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	TPP AG
Zentrifugen-Tubes (1,5 ml)	Trefflab

3.1.6. Geräte

A-Hyb Hybridisierungsstation	Miltenyi Biotec
BioDocAnalyse	Biometra
Biological safety cabinets Clan II	NuAire
BioPhotometer	Eppendorf
BioSpec-1601 E	Shimadzu
FACS Calibur™	Becton Dickinson
GenePix Professional 4200A	Molecular Devices
Hybridisierungskammer	Bio-Rad
Hypercassette	Bioscience
Hyperprocessor	Amersham
Inkubator Heracell (5% CO ₂ , 37°C, 96% relative Feuchte)	Heraeus
Magnetischer Midi Separator	Macs
Mikroskop Axiovert 40C	Zeiss
Mini trans-Blot Cell	Bio-Rad
Nucleofector I	Amaxa
PCR Block TGradient	Biometra
PCR Detection System (MyiQ single color Realtime)	Bio-Rad
Power PAC 3000	Bio-Rad
Pipettboy	Integra Biosciences

Schwenktisch WT16	Biometra
Sub-Cell GT	Bio-Rad
Thermomixer 5436	Eppendorf
Trans-Blot SD Semi-Dry-transfer Cell	Bio-Rad
Vortex TopMix FB15024	Fisher Scientific
Waage Analytic AC 210P MC1	Sartorius
Wasserbad	Memmert
Zentrifugen (Multifuge 1 S-R, Biofuge primoR und Biofuge fresco)	Heraeus

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

Zelllinien: Die Kultivierung der Zelllinien (U-937, MV4-11, HL-60, K-562 und PC-3) erfolgte im RPMI-Medium. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

Stammzellen: Die Aufreinigung der CD34⁺ Stammzellen aus Leukapherisaten erfolgte nach einem laborinternen Protokoll und dem Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit von MACS nach Herstellerangaben. CD34⁺ Stammzellen wurden im IMDM-Medium kultiviert. Für jedes Experiment wurde ein Zellpool aus drei verschiedenen Patientenproben erstellt.

Puffer A:	H ₂ O, 10% PBS, 10% FCS, 0,4% Natriumcitrat, pH 7,2
Puffer B:	H ₂ O, 10% PBS, 2,5% FBS, 1 U/ml DNase, 2,5mmol/l MgCl ₂ , pH 7,2
MgCl ₂ -Stammlösung:	500 nM MgCl ₂
DNase-Puffer:	10 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl ₂ , 50% Glycerol, pH 7,6
DNase-Lösung:	0,1g DNase (500M/mg) in 50 ml DNase-Puffer (1000U/ml)

Adhärente Zellen: Zunächst wurde das Medium abgesaugt. Anschließend wurden adhäre Zellen für 5 Minuten mit Accutase behandelt. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit dem RPMI-Medium wurden die Zellen von der Zellkulturplatte gelöst.

Zellstock: Nicht benötigte Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zellen wurden pelletiert, in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und anschließend in Kryoröhrchen bei -80°C bis zu ihrer Verwendung gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen in ein warmes Wasserbad (37°C) überführt, kurz angewärmt, in PBS gewaschen (5 Minuten bei 1000 rpm) und abschließend mit frischem Medium in Kultur genommen.

Zellzahl: Nach dem Auftragen einer 1:1 mit Methylenblau verdünnten Zellsuspension erfolgte die Bestimmung der Zellzahl durch die Auszählung der einzelnen Felder der Neubauer-Zählkammer.

Stimulation mit PMA: Die Zellen der Zelllinie U-937 wurden mit einer Konzentration von 300.000-500.000 Zellen/ml Medium in den Zellkulturflächen ausplattiert. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit 10 nM PMA. Die Kontrollzellen erhielten eine äquivalente Menge von 99%igem Ethanol. Das verwendete PMA wurde in Ethanol gelöst. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden durchflusszytometrische Analysen des Oberflächenmarkers CD11b, Zellfärbungen mit May-Grünwald-Giemsa nach Pappenheim und semiquantitative PCRs für den M-CSFR angefertigt. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. Im nächsten Versuchsaufbau wurden Microarrayanalysen nach 12, 24 und 48 Stunden durchgeführt. Des Weiteren wurden quantitative RT-PCRs von miR-221 und miR-222 nach 24, 48 und 72 Stunden angefertigt. Die qRT-PCRs wurden siebenmal wiederholt.

Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren: Die Zellen der Zelllinie MV4-11 wurden mit einer Zelldichte von ca. 500.000 Zellen/ml in den Zellkulturflaschen ausplattiert. Die Stimulation erfolgte mit 1 µM SU5614, 100 nM PKC412 oder einer äquivalenten Menge DMSO (Kontrolle). Die Zellen wurden einmalig zu Beginn des Experimentes behandelt. Nach 24 Stunden wurden quantitative RT-PCRs für miR-221 und miR-222 sowie Western Blot Analysen von STAT5 und STAT5p angefertigt. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet.

3.2.2. Durchflusszytometrische Analysen

Zur Detektion von CD-Oberflächenmarkern wurden durchflusszytometrische Analysen am FACS Calibur durchgeführt. Nach einer Waschprozedur mit 1xPBS wurden 100 µl der Zellsuspension (mindestens 50.000 Zellen/ml) mit 10 µl des direkt-konjugierten monoklonalen Antikörpers bei 4°C für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach einer Waschprozedur mit PBS, zum Entfernen nicht gebundener Antikörper, erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der Zellen in einer 250 µl 1xPBS Suspension. Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurden isotypspezifische Kontrollen durchgeführt. Die Antikörper waren mit PE markiert.

Zur Analyse der Daten wurden das Programm CellQuest (Becton Dickinson) und die Cyflogic-FACS Software (Version 1.1.0; Perttu Terho, Mika Korkeamäki, CyFlo Ltd.) verwendet.

3.2.3. Zellfärbungen nach Pappenheim

Die morphologischen Veränderungen der Zellen wurden mittels panoptischer Färbungen nach Pappenheim unter dem Mikroskop analysiert. Über einen Zentrifugenaufsatz wurden 100 µl der Zellsuspension (Konzentration ca. 150.000 Zellen/ml) auf einen Objektträger überführt. Die Zellsuspension wurde einmal mit dem Zentrifugenaufsatz für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und ein zweites Mal ohne den Zentrifugenaufsatz bei 1000 rpm für 5 Minuten. Im Anschluss an die Trocknung der Zellen wurden die Objektträger für 5 Minuten in einem May-Grünwald Bad gefärbt und anschließend kurz in 1xPBS gewaschen. Als nächstes folgte ein Bad in einer 1:15 verdünnten WRIGHT-Giemsa-Lösung für 15 Minuten. Abschließend wurden die Objektträger erst in 1xPBS und dann in sterilem Aqua dest. geschwenkt. Die getrockneten Objektträger wurden unter dem Mikroskop beurteilt.

3.2.4. RNA-Isolation

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Zellen wurde mittels TRIzol-Reagent vorgenommen. Im Anschluss an das Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml TRIzol-Reagent aufgenommen. Anschließend wurden 200 µl Chloroform hinzu gegeben und für 15 Sekunden gemischt. Nach 5 Minuten Wartezeit wurden die Zellen für weitere 5 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren entstehen drei Phasen: Die obere farblose Phase enthält die Gesamt-RNA, die mittlere Interphase beinhaltet die Proteine und die untere Phase enthält Chloroform. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und die RNA mit 700 µl Isopropanol gefällt. Nach 10 Minuten Wartezeit bei Raumtemperatur wurde die gefällte RNA für weitere 10 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde die RNA mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die getrockneten RNA-Pellets wurden in DEPC-Wasser gelöst. Der RNA-Gehalt wurde mittels Photometer bestimmt.

3.2.5. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen. Es wurden sequenzspezifische Primer verwendet.

Reverse Transkription: Die Transkription der RNA in komplementäre cDNA erfolgte mit dem ImProm II RT-Kit und dem Protokoll (Mai 2007) der Firma Promega nach Herstellerangaben.

PCR: Das ImProm II Protokoll von Promega wurde nach Herstellerangaben verwendet. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igem Agarosegel analysiert. Die Bandendetektion erfolgte via UV-Licht mittels Ethidiumbromid. Der DNA ladder Mix

diente als Kontrollmarker. Die PCR-Gele wurden mit der BioDoc Analyse 2.0 Software von Biometra ausgewertet.

50xTAE: 242 g Tris, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt
 2% Agarosegel: 2% Agarose in 1xTAE aufgekocht

3.2.6. Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Realtime-PCR dient der Bestimmung der Expression verschiedener microRNAs. Die Quantifizierung erfolgt über die Messung der Fluoreszenzfarbstoffe.

Reverse Transkription: Mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcriptions Kit von Applied Biosystem wurde die gesamt-RNA in einsträngige cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde das beigefügte TaqMan MicroRNA Assay Protokoll (Inversert P/N 4375222 REV B, 2006) von Applied Biosystems nach Herstellerangaben verwendet.

Realtime-PCR: Für die Realtime-PCR wurde das TaqMan MicroRNA Assay von Applied Biosystems gemäß des angegebenen Protokolls verwendet. Zur Datenanalyse wurden die Programme MyiQ (Version 2.0 von Bio-Rad) und RotorGene6 (Corbett Research) verwendet.

Realtime-PCR Auswertung: Die Auswertung der Realtime-PCRs erfolgte nach der delta-delta-Ct-Methode (Pfaffl, 2001). Für die Berechnung wurde ein Schwellenwert festgelegt, welcher im Bereich des linearen Anstieges der Amplifikationskurven liegt, um den Ct-Wert (cycle threshold) zu erhalten. Der Ct-Wert stellt den Schnittpunkt der Amplifikationskurven mit diesem Schwellenwert dar. Es wurde jeweils eine experimentspezifische Negativkontrolle verwendet. Normalisiert wurde immer zu U6-snRNA-2 (= RNU6B = U6).

Zur Normalisierung der Ct-Werte wurden die Ct-Werte der U6 (Referenz) von den Ct-Werten der zu untersuchenden microRNAs (Target) subtrahiert.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Target}} - Ct_{\text{Referenz}}$$

Die Berechnung der Expressionsdifferenz $\Delta(\Delta Ct)$ erfolgt durch Subtraktion des ΔCt -Wertes der Kontrolle vom ΔCt -Wert der stimulierten Probe.

$$\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct_{\text{Stimuliert}} - \Delta Ct_{\text{Kontrolle}}$$

Das Vielfache der Expressionsveränderung berechnet sich nach folgender Formel: **Expressionsveränderung = $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$**

3.2.7. Microarrayanalysen

Zur Durchführung des Experiments wurde das miRCURY LNA microRNA Array kit und das Protokoll von Exiqon 2.Version (November 2006) nach Herstellerangaben verwendet. Gewaschen wurde mit einer a-Hyp Hybridisierungsstation. Anschließend an den letzten Waschschrift wurde der Chip mit einer Luftdüse getrocknet und mit dem GenePix Professional 4200A gescannt. Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte mit zwei Wellenlängen (532 nm und 635 nm).

Für das Experiment wurden miRCURY LNA microRNA V8.1 Microarrays und die dazugehörigen GenePix Array List (GAL)-files verwendet.

GAL-File:

```
208000V8[1].0_208001V8.0_208002V8.0_batch_numbers_20234_or_larger_hsap
208000V8[1].1_208001V8.1_208002V8.1_lot_number_20278-20399_hsap
```

Auswertung der Microarrays: Nach dem Einlesen der Chips wurden die Daten mittels der GenePix Pro 6.0 Software (Axon Laboratorien) analysiert. Zur weiteren Datenanalyse wurden Excel und SPSS 17.0 verwendet.

Die eingescannten Bilder enthalten die Informationen über die Rot- und Grünfluoreszenzen. Mit Hilfe einer GAL-Datei wurde ein Gitter über das Microarray gelegt und somit die Zuordnung der Spots zu den jeweiligen microRNAs ermöglicht. Artefakte auf dem Chip wurden sowohl durch die Software als auch durch visuelle Kontrollen eliminiert. Die Signalintensitäten jedes einzelnen Spots wurden durch Subtraktion des lokalen Hintergrundes von der absoluten Intensität des Spots errechnet. Der jeweilige Hintergrund basiert auf der medianen Intensität des Gebietes um den entsprechenden Spot.

Die Normalisierung erfolgte zu U6, welche gleich eins gesetzt wurde. Die GenePix Software ermittelte anhand der Rohdaten die gemessenen Rot- und Grünfluoreszenz (Intensität) und das Verhältnis (Ratio of Median) aus der stimulierten Probe zur nicht stimulierten Probe. Ist die Expression einer microRNA unverändert, ist das Verhältnis eins. Je stärker die Expression verändert ist, desto mehr weicht das Verhältnis nach oben oder unten von eins ab.

Aus den vier zusammengehörigen Wiederholungen einer microRNA wurden aus den „Ratios of Median“ (stimuliert / nicht stimuliert) der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet. Die Mittelwerte mussten sowohl positive Werte, als auch größere Werte, als die berechnete Standardabweichung ergeben. Zur weiteren Analyse der Daten wurden nur microRNAs zugelassen, die folgende Einschlusskriterien erfüllen konnten:

$$\bar{x} > 0 \text{ und } \bar{x} > \sigma$$

Regulierte microRNAs wurden mit Hilfe des Mittelwertes und der Standardabweichung ermittelt.

Herunterreguliert: $\bar{x} + \sigma \leq 0,7$ sowie **Hochreguliert:** $\bar{x} - \sigma \geq 1,2$

Die statistische Signifikanz wurde mit dem **Student'schen t-Test** geprüft. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $\leq 0,05$ gewertet.

Je schwächer die gemessenen Fluoreszenzsignale sind, desto schwieriger ist es, eine signifikante Aussage über die Expressionsveränderung der microRNAs zu treffen. Diejenigen microRNAs, die die oben genannten Kriterien nicht erfüllen konnten, wurden daher aus der weiteren Datenanalyse entfernt.

3.2.8. Nukleofektion mit Amaxa

Die Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben mit dem cell line nucleofector kit V und dem Protokoll (Dezember 2007) von Amaxa.

Zunächst wurden die Zellen der Zelllinie U-937 zweimal mit reinem RPMI-Medium gewaschen. Dann wurden ca. 1×10^6 Zellen in 100 μ l Nucleofector Solution V resuspendiert und anschließend mit 2 μ g des Plasmids (pAL-FLT3-ITD bzw. pAL-FLT3-WT) transfiziert. Mittels Elektroporation wurde der Vektor in die Zelle transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit 500 μ l vorgewärmtem RPMI-Medium auf eine Zellkulturplatte überführt. FLT3-WT wurde als Kontrolle verwendet. Nach 24 Stunden wurde die totale RNA aus den Zellen gewonnen und qRT-PCRs für miR-221 und miR-222 angefertigt. Das Experiment wurde zweimal wiederholt. Aus den Ergebnissen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet.

3.2.9. LNA-Transfektion mit Lipofectamin Plus

Die Transfektion der locked nucleic acids (LNA) erfolgte nach einem modifizierten Lipofectamin Plus Protokoll von Exiqon.

Für den Versuch wurden je 1×10^6 Zellen der Zelllinie MV4-11 zweimal mit reinem RPMI-Medium gewaschen und im Anschluss in 500 μ l Opti-MEM I resuspendiert. Pro Probe wurden je 4 μ l LNA (LNA-221, LNA-222, LNA-221 + LNA-222 oder Scramble) und 8 μ l PLUS-Reagent zusammen für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der LNA PLUS-Reagent Mix mit 12 μ l Lipofectamin und 125 μ l Opti-MEM I versehen. Nach ca. 20 Minuten Inkubation wurde der Mix zu den Zellen hinzugegeben. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen erneut zweifach mit reinem RPMI-Medium gewaschen, bevor sie für 24 Stunden in 2 ml RPMI-Medium kultiviert wurden. Die Kontrolltransfektion erfolgte mit einer scramble-miR. Nach 24 Stunden wurden die Proteine aus den Zellen

gewonnen und mittels Western Blot analysiert. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt.

3.2.10. Gelelektrophorese von Proteinen

Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach ihrem Molekulargewicht. Die Zellen wurden nach dem Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes mit 500 µl RIPA-Puffer, 1% PMSF, 1% PIC und 0,1% 100 mM DTT versehen, gründlich gemischt und für 45 Minuten auf Eis gelagert. Nach weiteren 15 Minuten in der Zentrifuge (bei 13.000 rpm und 4°C) wurde der Überstand in ein neues Tube überführt und der Proteingehalt mittels Bradford Methode gemessen. Hierfür wurden 2 µl Probe, 798 µl Aqua dest. und 200 µl Protein assay reagent vermischt und der Proteingehalt gemessen. Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde ein 12%iges Tris-glycine SDS-Polyacrylamidgel verwendet.

Trenngel 12% (10 ml):	3,3 ml Aqua dest., 4,0 ml Rotiphorese Gel 30, 2,5 ml 1,5 M Tris (pH=8,8), 100 µl 10xSDS-Page, 100 µl 10% APS, 4 µl TEMED
Sammelgel 5% (10 ml):	5,735 ml Aqua dest., 1,665 ml Rotiphorese Gel 30, 2,5 ml 0,5 M Tris (pH =6,8), 100 µl 10xSDS-Page, 50 µl 10% APS, 10 µl TEMED
5xLadepuffer (8 ml):	3,8 ml Aqua dest., 1 ml 0,5 M Tris-HCl (pH=6,8), 0,8 ml Glycerol, 1,6 ml 10xSDS-Page, 0,4 ml β-Mercaptoethanol, 0,4 ml 0,05% Bromphenolblau

20 µl des Protein-Extraktes wurden mit 5 µl 5xLadepuffer gemischt, für 10 Minuten auf 95°C erhitzt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Im Anschluss an das Befüllen der Kammern mit 1xSDS Elektrophoresepuffer wurde das Gel beladen und die Proteine entsprechend ihrer Größe bei 200 V für 40 Minuten aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder verwendet.

Western Blot: Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittels SDS-Page wurden diese auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert.

Das Proteingel, die Whatman Membran und die beiden Nitrocellulose Filter wurden mit dem Transferpuffer befeuchtet. Im Trans-Blot SD, bei 23 V für 45 Minuten, wurden die Proteine auf die Membran überführt. Der Erfolg des Transfers konnte anhand des aufgetragenen Markers beurteilt werden. Die Membran wurde anschließend einmal mit Aqua dest. gewaschen und für 1 Stunde im Blocking-Puffer bei Raumtemperatur geblockt.

Tabelle 4: Zuordnung der primären und sekundären Antikörper.

Primäre AK	Sekundäre AK
Anti-p27	Goat-anti-mouse IgG-HRP
Anti-GAPDH	Goat-anti-rabbit IgG-HRP
Anti-STAT5	Goat-anti-rabbit IgG-HRP
Anti-phospho-STAT5	Goat-anti-rabbit IgG-HRP

Der primäre Antikörper wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Zum Entfernen nicht gebundener Antikörper wurde dreimal für 15 Minuten mit PBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem jeweiligen sekundären Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBST entfernt. Anschließend wurde die Entwicklungslösung aufgetragen und nach 2 Minuten wurde die Membran in die Hypercassette überführt. Zur Detektion der ausgelösten Lumineszenz wurde die Membran auf einen sensitiven Hyperfilm™ ECL überführt und im Hyperprocessor entwickelt.

Die Beurteilung der entwickelten Hyperfilme erfolgte mit ImageJ 1.37c (National Institutes of Health) und Microsoft Excel (2002).

RIPA-Puffer:	100 nM NaCl, 50 mM Tris, 0,5% Desoxycholat, 0,5% SDS, 0,5% Igepal, pH=8,0
PBST:	1xPBS, 0,1% Tween20
TBST:	0,1 M Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20, pH=7,4
Stripping-Puffer:	2% SDS, 62,5 mM Tris, 0,1 M β-Mercaptoethanol
Transfer-Puffer:	1xSDS-Page, 20% Methanol
Blocking-Puffer:	50 ml PBST, 2,5 g Milchpulver
Lösung A:	200 ml 0,1 M Tris, 50 mg Luminol
Lösung B:	10 ml DMSO, 11 mg para-Hydroxycoumarinsäure
Entwicklungslösung:	2 ml Lösung A, 200 µl Lösung B, 0,6 µl 30% H ₂ O ₂

3.2.11. Statistische Auswertungen

Weiterführende statistische Auswertungen und graphische Darstellungen wurden mit Microsoft Excel (2002) und SPSS (Version 17.1) durchgeführt. Zur Beurteilung der statistischen Signifikanz wurde der student'sche T-Test verwendet. Ein P-Wert von 0,05 oder weniger wurde als signifikant betrachtet. Die Ergebnisse wurde als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

4. Ergebnisse

4.1. Die Zelllinie U-937 differenziert nach der Stimulation mit PMA zu Monozyten / Makrophagen

Die humane hämatopoetische Zelllinie U-937 ist ein etabliertes Modell der monozytären Differenzierung. Nach der Stimulation mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) differenzieren die Zellen der Zelllinie U-937 vollständig zu Monozyten / Makrophagen (Hass et al., 1989). Die Überprüfung der erfolgreichen Differenzierung erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analysen des Oberflächenmarkers CD11b, Zellfärbungen mit May-Grünwald-Giemsa nach Pappenheim und semiquantitativen PCRs für den M-CSFR.

U-937 Zellen wurden über einen Zeitraum von drei Tagen (24, 48 und 72 Stunden) mit 10 nM PMA behandelt und analysiert. Die Kontrollzellen wurden äquivalent mit 99%igem Ethanol behandelt. Abbildung 2A zeigt exemplarisch eine durchflusszytometrische Analyse des Oberflächenmarkers CD11b. Im Verlauf des Experiments nimmt der Anteil der CD11b exprimierenden Zellen in der mit PMA behandelten Gruppe kontinuierlich zu (Abbildung 2B). Nach 24 Stunden kann der myeloide Differenzierungsmarker CD11b auf $19,8\% \pm 10,9\%$, nach 48 Stunden auf $54,4\% \pm 8,3\%$ und nach 72 Stunden auf $62,4\% \pm 4,8\%$ der mit PMA stimulierten Zellen nachgewiesen werden. Die Kontrollzellen zeigen zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Expression des Oberflächenmarkers CD11b. Die Werte entsprechen den Mittelwerten von drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Mit einem p-Wert von $\leq 0,05$ sind die Messungen signifikant gegenüber der Kontrolle.

Die morphologischen Veränderungen der Zellen wurden nach vorangehender Zytopsinfixation mit einer May-Grünwald-Giemsa Zellfärbung nach Pappenheim sichtbar gemacht (Abbildung 2C). Im Blut zirkulierende Monozyten zeigen in der Pappenheimfärbung ein charakteristisches Erscheinungsbild. Die großen Zellen sowie die Zellkerne haben eine irreguläre Kontur, der grau-blaue Zytoplasmaanteil ist erhöht und zeigt feine Granulationen (Ostendorf und Seeber, 1997). Mit PMA stimulierte Zellen zeigen bereits nach 24 Stunden deutliche morphologische Veränderungen. Die Zellen erscheinen größer und der Plasmaanteil nimmt zu. Das Kern-Plasma-Verhältnis verschiebt sich zugunsten des Plasmas. Das Zytoplasma der stimulierten Zellen stellt sich fein granuliert dar. Der nun gelappte Kern verlagert sich in eine exzentrische Position und die Zellen werden zum Teil adhärent (Abb. 2C oben). Auch bei längerer Stimulation zeigen die Kontrollzellen keine morphologischen Veränderungen. Die Zellen bleiben klein und rundlich. Der prominente und runde Kern liegt zentral. Das

Zytoplasma stellt sich homogen ohne Granula dar und nimmt nur einen geringen Teil der Zelle ein (Abb. 2C unten).

Der M-CSFR wird unter anderem auf monozytären Vorläufern, Monozyten und Makrophagen exprimiert (Guilbert und Stanley, 1980; Byrne et al., 1981; Tushinski et al., 1982). Der Nachweis des M-CSFR erfolgte mittels einer semiquantitativen PCR. Nach der Behandlung mit PMA zeigen die U-937 Zellen zu allen Messzeitpunkten eine deutliche Expression des Oberflächenmarkers M-CSFR, wohingegen die Kontrollzellen zu keinem Zeitpunkt eine Expression des Rezeptors aufweisen (Abbildung 2D).

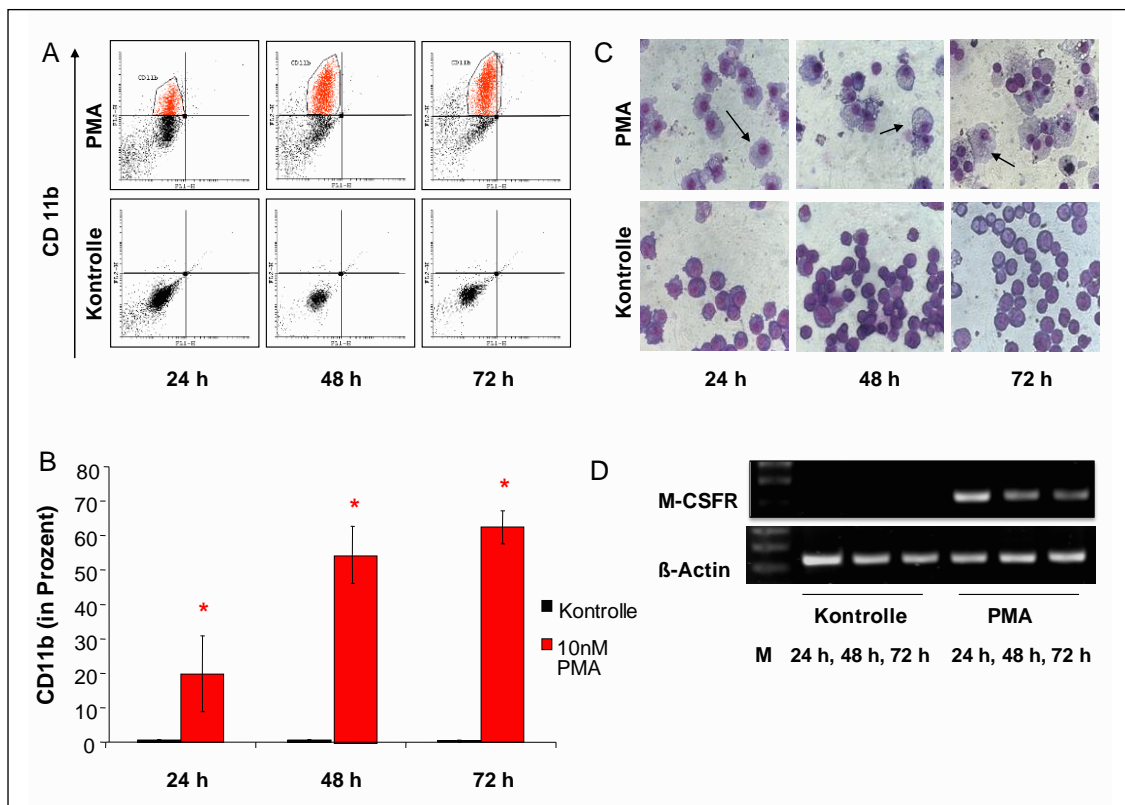


Abbildung 2: Differenzierung von U-937 Zellen zu Monozyten / Makrophagen nach der Stimulation mit PMA zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden im Vergleich zur Kontrolle.

A: Exemplarische Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse des Oberflächenmarkers CD11b.

B: Balkendiagramm der durchflusszytometrischen Analysen des Oberflächenmarkers CD11b in U-937 Zellen nach der Stimulation mit 10 nM PMA bzw. 99% Ethanol (Kontrolle). Die Balken repräsentieren den Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. * entspricht $p \leq 0,05$.

C: Morphologische Veränderung von U-937 Zellen nach 10 nM PMA bzw. 99% Ethanol. Zytospinfixation und Zellfärbungen mit May-Grünwald-Giemsa nach Pappenheim (Vergrößerung: 400x). Die Markierungen zeigen exemplarisch differenzierte Zellen.

D: Semiquantitative PCR für den M-CSFR in U-937 Zellen nach 10 nM PMA bzw. 99% Ethanol. M = Bandenmarker. Als Ladekontrolle wurde β -Actin verwendet.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der morphologischen und immunphänotypischen Analysen eine erfolgreiche Differenzierung der Zelllinie U-937 zu Monozyten / Makrophagen nach der Stimulation mit 10 nM PMA.

4.2. PMA induziert eine spezifische microRNA Expression in der Zelllinie U-937

MicroRNAs sind eine Gruppe kleiner, nicht kodierender RNAs, die in verschiedene biologische Prozesse und in die Hämatopoese involviert sind (Chen et al., 2004; Xu et al., 2004; Chen und Lodish, 2005; Karp und Ambros, 2005). Das Augenmerk dieser Arbeit galt den microRNAs während der monozytären Differenzierung. Hierzu wurde die Zelllinie U-937 mit 10 nM PMA bzw. 99%igem Ethanol (Kontrolle) stimuliert. Nach 12, 24 und 48 Stunden wurde die RNA der Zellen isoliert und mittels *miRCURY™ LNA microRNA Arrays* von EXIQON analysiert. Die Microarrays wurden zu miR-U6-2 normalisiert. Zur Identifizierung derjenigen microRNAs, die in die Monopoese involviert sind, wurden die Expressionsdaten der stimulierten Zellen (PMA) zu den Werten der Kontrolle (Ethanol) ins Verhältnis gesetzt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt.

MicroRNAs mit einer signifikant veränderten Expression ($p \leq 0,05$) sind in den Tabellen 5-7 (siehe Anlagen) aufgelistet. Die Auswertung des Microarrays nach 12 Stunden (Tabelle 5) ergibt 38 signifikant veränderte microRNAs, hiervon sind 28 hochreguliert und 10 herunterreguliert. Tabelle 6 (24 Stunden) zeigt fünf hochregulierte und 27 herunterregulierte microRNAs. Im letzten Array nach 48 Stunden (Tabelle 7) finden sich 26 hochregulierte und 11 herunterregulierte microRNAs. In den drei Arrays können verschiedene microRNA Expressionsgruppen identifiziert werden. Einzelne microRNAs sind nicht in allen Arrays als signifikant verändert nachweisbar, während andere microRNAs dauerhaft reguliert sind. Die letzte Gruppe beinhaltet diejenigen microRNAs, die im Verlauf eine gegensätzliche Regulation zeigen.

Zur Gruppe der nicht dauerhaft regulierten microRNAs gehören unter anderem die miR-155 und die miR-612. Die miR-155 zeigt nach 12 Stunden eine starke Hochregulation (6,57-fach). In den nachfolgenden Arrays (24 und 48 Stunden) ist die miR-155 nicht signifikant verändert. Im ersten Array (12 Stunden) ist die miR-612 nicht signifikant verändert. Nach 24 und 48 Stunden zeigt miR-612 eine 1,58-fach bzw. eine 1,36-fach erhöhte Expression. Die miR-29a ist ein Beispiel für eine microRNA mit einer gegensätzlichen Regulation. Sie stellt sich nach 12 Stunden als hochreguliert (2,45-fach) und nach 48 Stunden als herunterreguliert (0,47-fach) dar.

In den microRNA Expressionsanalysen konnten vier zu allen Zeitpunkten induzierte microRNAs identifiziert werden (Abbildung 3A). Es handelt sich um miR-23a, miR-21 und das Cluster miR-221 / -222. Im Mittel zeigt die miR-23a eine 1,7-fach und die miR-21 eine 3,1-fach erhöhte Expression. Die Expression der miR-221 ist zu den verschiedenen Messpunkten durchschnittlich 3,2-fach erhöht. Im Gegensatz dazu zeigt die miR-222 eine größere Varianz. Die Expression der miR-222 ist im Vergleich zur Kontrolle 6,6-fach (12 Stunden) bzw. 1,6-fach (48 Stunden) erhöht.

Eine erhöhte Expression von miR-221 / -222 konnte bereits in verschiedenen, überwiegend soliden Tumoren gezeigt werden (Ciafrè et al., 2005; Galardi et al., 2007; Visone et al., 2007; Felicetti et al., 2008). Innerhalb der Hämatopoese und insbesondere im myeloiden System ist über diese beiden microRNAs noch wenig bekannt. Zur Verifizierung der Hochregulation des microRNA-Clusters miR-221 / -222 durch PMA wurde die Expression der beiden microRNAs gezielt mit qRT-PCRs überprüft. Die Zelllinie U-937 wurde mit 10 nM PMA stimuliert. 99% Ethanol diente als Kontrolle. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden quantitative RT-PCRs für miR-221 und miR-222 durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte, wie im vorherigen Experiment, zu U6-2.

Aus Abbildung 3B geht die bereits gezeigte Hochregulation der beiden microRNAs nach der Stimulation mit PMA hervor. Nach der Behandlung mit PMA zeigt sich zu allen Zeitpunkten eine erhöhte Expression von miR-221 und miR-222. Die qRT-PCRs zeigen im Vergleich mit den Microarrays eine größere Varianz. Die erhöhte Expression der miR-221 variiert von einer 3,4-fachen (12 Stunden) zu einer 1,3-fachen (72 Stunden) Induktion. Die miR-222 ist zu den verschiedenen Messpunkten im Mittel 2,6-fach erhöht exprimiert.

Zusammengefasst zeigen beide Experimente eine Hochregulation des miR-221 / -222 Clusters während der durch PMA induzierten myeloiden Differenzierung der Zelllinie U-937.

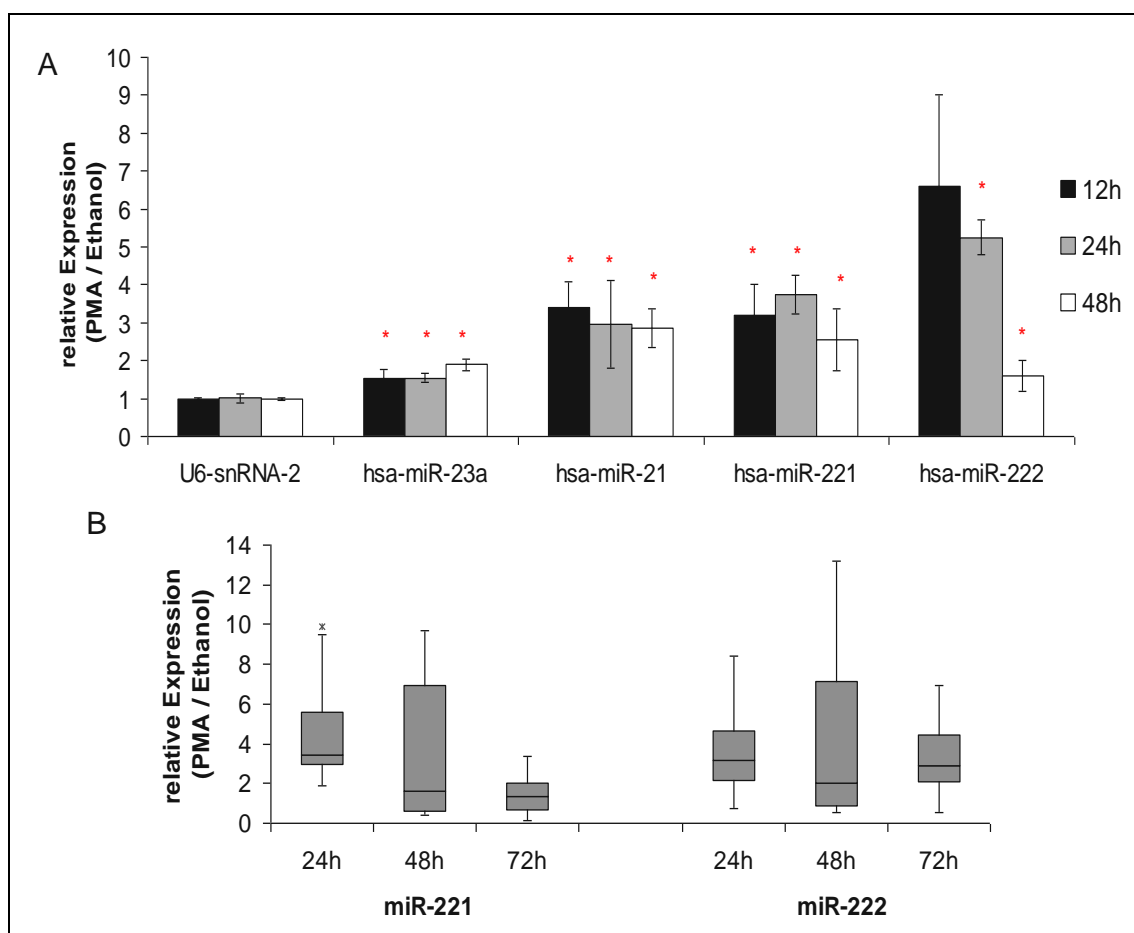


Abbildung 3: Spezifische microRNA Expression während der Differenzierung zu Monozyten / Makrophagen in U-937 Zellen nach PMA.

A: MicroRNA Microarray Expressionsanalyse in U-937 Zellen nach 10 nM PMA (Kontrolle: 99% Ethanol). Darstellung der Ratios (PMA / Ethanol) von miR-23a, miR-21, miR-221 und miR-222 zu den Zeitpunkten 12, 24 und 48 Stunden. * entspricht: p-Wert $\leq 0,05$. Normalisiert zu U6-snRNA-2.

B: Induktion von miR-221 und miR-222 nach 10 nM PMA in U-937 Zellen. Darstellung der relativen Expression (PMA / Ethanol) als Boxplot nach 24, 48 und 72 Stunden. Normalisiert zu U6-2. Dargestellt sind die Ergebnisse von sieben unabhängigen qRT-PCRs. Der graue Bereich entspricht der relativen Expression (PMA / Ethanol) der mittleren 50% der Proben. Die obere und untere Begrenzung der grauen Box stellen das 1. und 3. Quartil dar.

4.3. Das microRNA-Cluster miR-221 / -222 zeigt eine zelllinienspezifische Expression

Die bisherigen Ergebnisse der Microarrays und qRT-PCRs deuten auf eine Hochregulation von miR-221 und miR-222 in U-937 Zellen während der durch PMA induzierten monozytären Differenzierung hin. Zur näheren Quantifizierung des microRNA-Clusters wurden weitere, überwiegend hämatopoetische Zelllinien wie MV4-11, HL-60 sowie K-562 hinzugezogen und analysiert. Eine erhöhte Expression des

microRNA-Clusters miR-221 / -222 in der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 wurde bereits beschrieben und diente als positive Kontrolle (Galardi et al., 2007). Frisch ausplattierte, nicht behandelte CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen wurden als nicht maligne Referenz ausgewählt. Die Messung der Grundexpression von miR-221 / -222 erfolgte mittels qRT-PCRs. Die Expressionswerte wurden zu U6-2 normalisiert und relativ zur Expression der CD34⁺ Stammzellen dargestellt (Abbildung 4).

Die humane AML-Zelllinie MV4-11 zeigt eine knapp 2-fach höhere Expression von miR-221 im Vergleich zu den CD34⁺ Stammzellen. Die Expression der miR-222 ist in MV4-11 Zellen und CD34⁺ Zellen identisch. Verglichen mit den CD34⁺ Stammzellen weisen die beiden Zelllinien U-937 und HL-60 eine verminderte Expression von miR-222 bei vergleichbarer Expression von miR-221 auf. Die humane CML-Zelllinie K-562 zeigt keine messbare Expression der beiden untersuchten microRNAs. Die Prostatakarzinomzelllinie PC-3 hat eine höhere Expression von miR-221 und miR-222 im Vergleich mit den CD34⁺ Stammzellen. Die relative Expression von miR-221 ist in allen Zelllinien höher als die Expression von miR-222.

Insbesondere die knapp 2-fach höhere Expression von miR-221 in der FLT3-ITD assoziierten Zelllinie MV4-11 hebt sich gegenüber den CD34⁺ Stammzellen und den anderen hämatopoetischen Zelllinien ab.

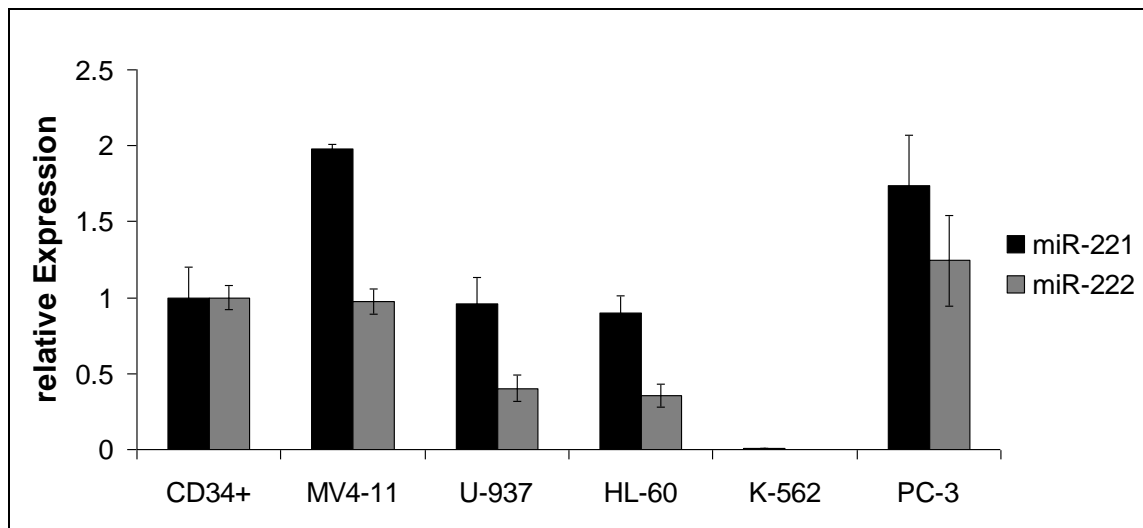


Abbildung 4: Relative Expression von miR-221 und miR-222 in verschiedenen Zelllinien im Verhältnis zur Expression in frisch ausplattierten CD34⁺ Stammzellen.

Mittels qRT-PCR analysierte miR-221 / -222 Expression. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

4.4. Die Expression von miR-221 und miR-222 sinkt nach der Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren

Rezeptortyrosinkinasen (RTK) haben zahlreiche regulierende Funktionen, unter anderem während der Apoptose, der Differenzierung und der Zellmigration (Zwick et al., 2001). Die FLT3-Rezeptortyrosinkinase wird bevorzugt auf hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert (Lyman und Jacobsen, 1998). FLT3-ITD-Mutationen finden sich gehäuft bei hämatologischen Erkrankungen (Nakao et al., 1996).

Da im vorangegangenen Experiment die Zelllinie MV4-11 die höchste Expression von miR-221 im Vergleich mit den anderen myeloiden Zelllinien aufgewiesen hat, sollte nachfolgend der Einfluss von FLT3-ITD auf die Expression der miR-221 und miR-222 untersucht werden. Hierfür wurden MV4-11 Zellen mit verschiedenen Proteinkinaseinhibitoren (PKI) behandelt. PKC412 ist ein FLT3-RTK-Inhibitor, der die Tyrosinphosphorylierung des FLT3-Rezeptors hemmt (Weisberg, Boulton et al., 2002) und somit auch den nachgeordneten STAT5-Signalweg in FLT3-ITD Zellen (Grundler, Thiede et al., 2003). SU5614 ist ebenfalls ein FLT3-RTK-Inhibitor sowie auch von KIT und PDGFR (Krystal et al., 2001; Yee et al., 2002).

MV4-11 Zellen wurden für 24 Stunden mit den Inhibitoren PCK412 (100 nM) oder SU5614 (1 μ M) behandelt. Als Kontrolle wurde eine äquivalente Menge DMSO verwendet. Die Auswirkung der Proteinkinaseinhibitoren auf den nachgeordneten Signalweg von FLT3-ITD wurde mittels Western Blot unter der Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen STAT5 bzw. pSTAT5 nachgewiesen. In den mit PKI behandelten Zellen kann im Gegensatz zur Kontrolle keine Phosphorylierung von STAT5 nachgewiesen werden (Abbildung 5A). Zum Nachweis der miR-221 / -222 Expression wurde die RNA der Zellen isoliert und qRT-PCRs durchgeführt. Als Folge der PKC412 Behandlung sinkt die Expression von miR-221 und miR-222 um ca. 20%. Die Applikation von SU5614 vermindert die Expression der beiden microRNAs um knapp 60% gegenüber der Kontrolle (Abbildung 5B).

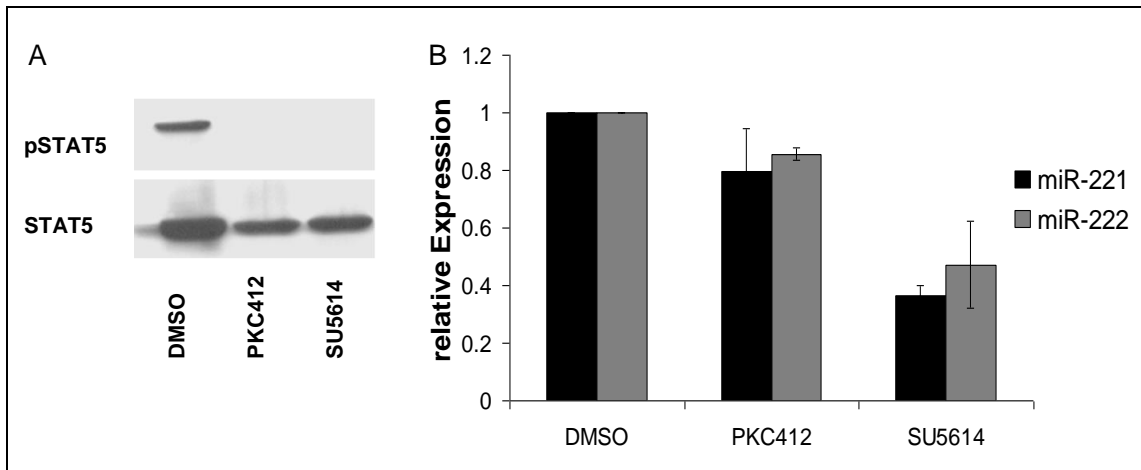


Abbildung 5: Die Blockade des FLT3-ITD-Signalweges mit Tyrosinkinaseinhibitoren verringert die Expression von miR-221 und miR-222 in MV4-11 nach 24 Stunden.

A: Western Blot zum Nachweis der STAT5 Phosphorylierung nach der Behandlung mit PKC412 und SU5614. Die Kontrollzellen wurden mit DMSO behandelt. STAT5 wurde als Kontrolle verwendet.

B: Mittels qRT-PCR analysierte Expression von miR-221 / -222 nach einmaliger PKI-Gabe. Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

4.5. Die Überexpression von FLT3-ITD in U-937 Zellen führt nicht zur Induktion von miR-221 / -222

Zur weiteren Überprüfung des Einflusses von FLT3-ITD auf die Expression von miR-221 / -222 wurde FLT3-ITD bzw. FLT3-WT (wildtyp) in U-937 Zellen mittels transientser Nukleofektion überexprimiert. Nach 24 Stunden wurde die RNA der transfizierten Zellen gewonnen und qRT-PCRs für die Expression von miR-221 und miR-222 durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte über die U6-2.

Entgegen der Hypothese, dass FLT3-ITD für die Hochregulation des miR-221 / -222 Clusters in der Zelllinie MV4-11 verantwortlich ist, führte die Überexpression von FLT3-ITD in U-937 Zellen nicht zur Induktion der miR-221 bzw. miR-222 (Abbildung 6). Verglichen mit der Kontrolle (WT) zeigt die miR-221 eine Herunterregulation um ca. 50% auf $0,5 \pm 0,1$. Die miR-222 weist eine Tendenz zur Herunterregulation ($0,9 \pm 0,1$) gegenüber der Kontrolle auf.

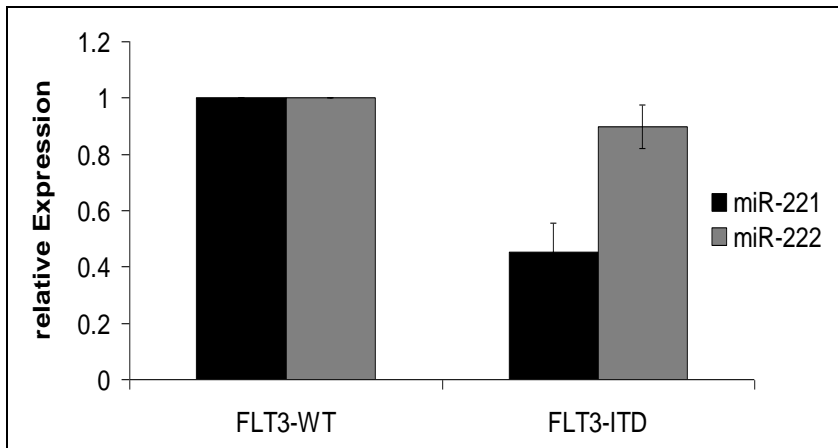


Abbildung 6: Die Überexpression von FLT3-ITD in U-937 Zellen nach 24 Stunden führt nicht zur Induktion von miR-221 / -222.

Mittels qRT-PCR analysierte Expression von miR-221 und miR-222 nach der Überexpression von FLT3-ITD im Vergleich zur Kontrolle (FLT3-WT). Normalisiert wurde zu U6-2. Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

4.6. P27^{Kip1} ist ein putatives Ziel von miR-221 / -222

Zur Identifikation potentieller Ziele von miR-221 / -222 wurden frei zugängliche Datenbanken verwendet. Durch eine Analyse dieser Datenbanken wurde die p27^{Kip1} (CDKN1B) mRNA als mögliches Ziel der miR-221 / -222 identifiziert (www.targetscan.org, Version 7.1). Bei p27^{Kip1} handelt es sich um einen bekannten Zellzyklusregulator (Koff, 2006) und Tumorsuppressor (le Sage et al., 2007). Im 3'untranslatierten Bereich (3'UTR) von p27^{Kip1} konnten zwei potentielle Bindestellen für miR-221 / -222 ermittelt werden. Die Binderegionen der miR-221 / -222 in der 3'UTR von p27^{Kip1} sind in verschiedenen Organismen stark konserviert (Abb. 7).

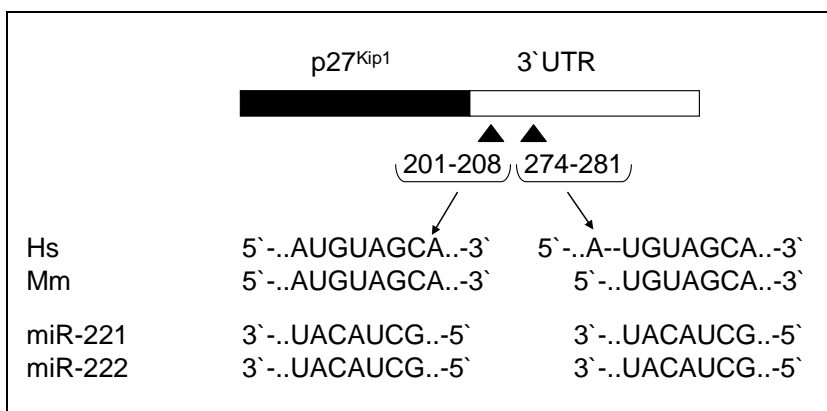


Abbildung 7: Potentielle Bindestellen von miR-221 / -222 in der 3'UTR von p27^{Kip1}.

Schematische Darstellung der hochkonservierten genomischen „seed sequenz“ von miR-221 und miR-222 in der 3'UTR von p27^{Kip1} in verschiedenen Spezies. P27^{Kip1} beinhaltet zwei potentielle Bindesequenzen von miR-221 / -222 (www.targetscan.org, Version 7.1). Hs- H. sapiens, Mm- M. musculus.

Zur Quantifizierung des p27^{Kip1} Proteinlevels wurden die bereits ausgewählten Zelllinien mittels Western Blot analysiert. Die p27^{Kip1} Proteinlevel wurden densitometrisch quantifiziert und mittels GAPDH normalisiert. Anschließend erfolgte eine Darstellung relativ zu frisch ausplattierten humanen CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen.

Die Proteinexpression von p27^{Kip1} variiert stark zwischen den untersuchten Zelllinien (Abbildung 8A). Die höchste Konzentration von p27^{Kip1} kann in unbehandelten U-937 Zellen nachgewiesen werden. Die CML-Zelllinie K-562 zeigt ebenfalls eine deutliche p27^{Kip1} Expression. Die Zelllinie HL-60 weist die geringste Grundexpression von p27^{Kip1} auf. Fasst man die relative Expression von miR-221 / -222 (Abbildung 4) und die Proteinexpression von p27^{Kip1} zusammen, kann weder eine direkte noch eine inverse Korrelation zwischen der Expression des microRNA-Clusters und dem p27^{Kip1} Proteinlevel festgestellt werden (Abbildung 8B).

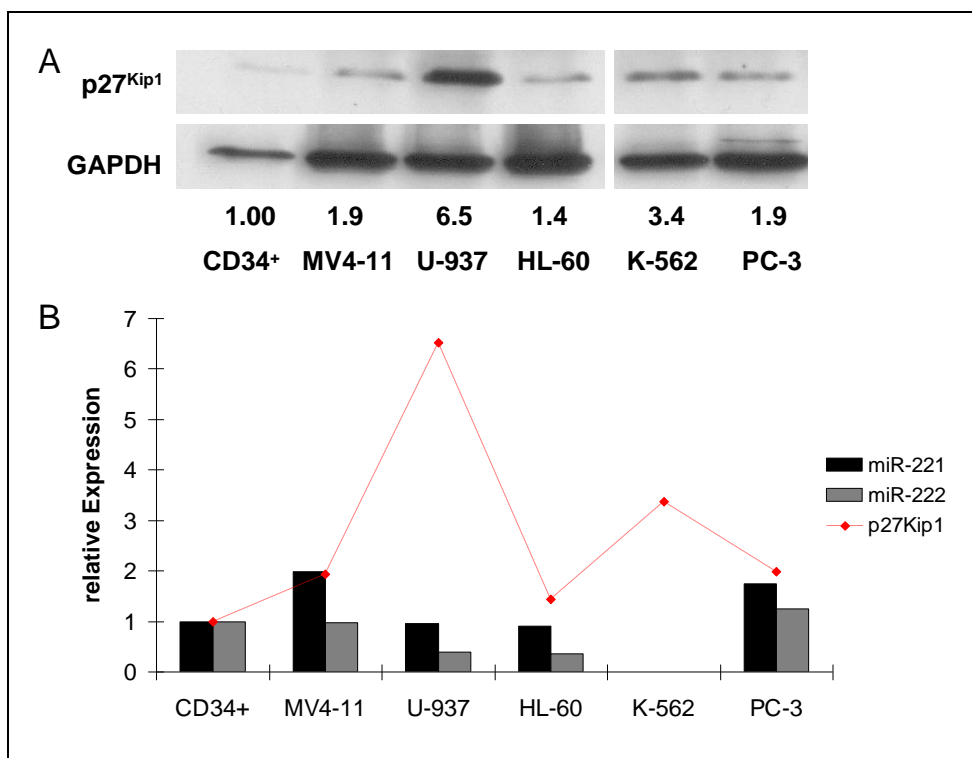


Abbildung 8: P27^{Kip1} Proteinexpression in verschiedenen Zelllinien.

A: Im Western Blot Verfahren wurden die Proteinlevel von p27^{Kip1} in verschiedenen Zelllinien untersucht. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Die Analyse erfolgte durch densitometrische Auswertung und anschließender Normalisierung mit den ermittelten Werten von GAPDH. Die Werte entsprechen den Mittelwerten von zwei Experimenten.

B: Zusammenfassende Darstellung der Expression von miR-221 / -222 mit der Grundexpression von p27^{Kip1} in verschiedenen Zelllinien relativ zur Expression in CD34⁺ Stammzellen.

4.7. Der kombinierte LNA Knockdown von miR-221 + miR-222 erhöht das Proteinlevel von p27^{Kip1}

MicroRNAs regulieren die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene durch eine Interaktion zwischen microRNA und Ziel-mRNA. Als Folge kommt es zu einer Hemmung der Translation bzw. Zerteilung der mRNA, gefolgt von einer Induktion der RNA Degradierung des Ziels (Bartel, 2004). Mittels des spezifischen locked nucleic acids (LNA) vermittelten microRNA Knockdown wird eine effektive und sequenzspezifische Komplementärinterferenz bewirkt, wodurch der hemmende Effekt der microRNA auf die Proteinexpression aufgehoben wird. Die microRNA Knockdowntechnik kann somit zur Bestätigung der biologischen Funktion verwendet werden (Orom et al., 2006).

Um zu analysieren, ob p27^{Kip1} ein Ziel des Clusters miR-221 / -222 darstellt, wurden MV4-11 Zellen mit spezifischen LNA transfiziert. Es wurde ein Versuchsaufbau gewählt, in welchem jeweils die miR-221 bzw. miR-222 einzeln, als auch beide microRNAs zusammen untersucht wurden. 24 Stunden nach der Transfektion wurde die Proteinexpression von p27^{Kip1} mittels Western Blot analysiert. Nach densitometrischer Quantifizierung wurden die p27^{Kip1} Proteinlevel mittels GAPDH normalisiert und anschließend relativ zur scramble-LNA dargestellt (Abbildung 9).

Weder der selektive Knockdown von miR-221, noch von miR-222 hat einen Effekt auf das Proteinlevel von p27^{Kip1}. Der kombinierte Knockdown (miR-221 + miR-222) führt zu einer Erhöhung der p27^{Kip1} Proteinexpression um ca. 40% ($1,4 \pm 0,3$) gegenüber der Kontrolle.

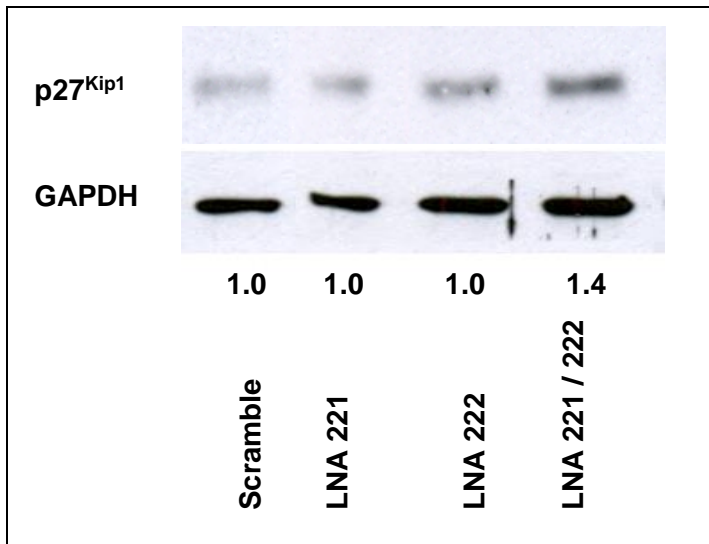


Abbildung 9: Proteinexpression von p27^{Kip1} nach LNA Knockdown (miR-221, miR-222 bzw. miR-221 + miR-222) in MV4-11 Zellen nach 24 Stunden im Vergleich zur Kontrolle.

Mittels Western Blot wurde die p27^{Kip1} Proteinexpression analysiert. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Die Analyse erfolgte durch densitometrische Auswertung und anschließender Normalisierung mit den ermittelten Werten von GAPDH. Die Darstellung erfolgt relativ zur Scramble (Kontrolle). Die Werte entsprechen den Mittelwerten von drei Experimenten.

5. Diskussion

5.1. Hintergrund der Arbeit

Die Hämatopoese bezeichnet die Bildung und Reifung von Blutzellen. Sie ist gekennzeichnet durch eine Abfolge streng regulierter und dynamischer Prozesse. Pluripotente hämatopoetische Stammzellen durchlaufen während ihrer Differenzierung verschiedene Stadien (Ogawa, 1993). Störungen innerhalb dieser Prozesse können zu einem Ungleichgewicht von Differenzierung, Proliferation und Apoptose führen. Als Folge dieses Ungleichgewichtes kann es unter anderem zu einer fehlenden Differenzierung bei gleichzeitig übermäßiger Vermehrung von unreifen Vorläuferzellen kommen (Appelbaum et al., 2001). Eine Analyse der zugrunde liegenden Regulationsmechanismen und deren Störfaktoren bilden die Basis für das Verständnis der daraus entstehenden Erkrankungen, sowie die Entwicklung von möglichen Therapiemethoden. Neben verschiedenen Transkriptionsfaktoren haben zunehmend auch microRNAs entscheidende Rollen innerhalb dieser Prozesse (Chen et al., 2004; Chen und Lodish, 2005).

Die Entdeckung der microRNAs war ein wichtiger Schritt in der modernen Molekularbiologie. MicroRNAs können entscheidende Funktionen in verschiedenen biologischen Prozessen haben, unter anderem in der Entwicklung, Differenzierung, Proliferation und Apoptose (Xu et al., 2004; Cheng et al., 2005; Karp und Ambros, 2005). In den letzten Jahren wurde intensiv die direkte Verbindung zwischen den microRNAs und ihren biologischen Funktionen erforscht (Esquela-Kerscher und Slack, 2006). Ein vollständiges Verständnis der Rolle der microRNAs kann nur durch eine genaue Analyse ihrer Wirkmechanismen in verschiedenen Zell- und Tumorformen erfolgen. Daher lag ein weiteres Augenmerk der Forschung in der Identifizierung von regulierten microRNAs in menschlichen Tumoren (Calin und Croce, 2006; Cho, 2007). Eine einzelne microRNA kann mehrere hundert Ziel-mRNAs besitzen, somit bleibt die Identifikation dieser Ziele eine wichtige Aufgabe. Neben der Bestätigung der Interaktion zwischen microRNA und mRNA ist auch die Validierung der Effekte der microRNA auf seine Ziele essenziell.

5.2. U-937 als Modell der monozytären Differenzierung

Monozyten / Makrophagen gehören dem humanen mononukleären Phagozytensystem an. Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr und der Tumorüberwachung (Grage-Griebenow et al., 2001). Die Mechanismen ihrer Differenzierung und Regulation sind essentiell zum Verständnis dieser Zellen. Die

Monopoese geht mit der Expression verschiedener Gene, Oberflächenmarker und morphologischer Veränderungen einher (Valledor et al., 1998).

Als Modell für die Differenzierung zu Monozyten / Makrophagen wurde die humane histiozytäre Lymphomzelllinie U-937 verwendet. Die Zellen stammen ursprünglich aus der Pleuraflüssigkeit eines Patienten mit einem diffusen histiozytären Lymphom (Sundstrom und Nilsson, 1976). PMA aktiviert die Proteinkinase C und induziert auf diesem Weg die Differenzierung der Zelllinie U-937 zu Monozyten / Makrophagen. Somit wird eine Analyse dieser Zellen während der Differenzierung ermöglicht (Pedrinaci et al., 1990; Trowbridge und Thomas, 1994).

Zunächst sollte die Funktionsweise des gewählten Modells überprüft werden. Hierfür wurden U-937 Zellen mit 10 nM PMA stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten (24, 48 und 72 Stunden) auf die Expression spezifischer Oberflächenmarker und ihrer morphologischen Veränderungen hin analysiert. Nach der Stimulation mit PMA nahm die Expression des Oberflächenmarkers CD11b stetig zu. Dieses Ergebnis korreliert mit der Arbeit von Ziegler und Kollegen, die CD11b als monozytären Marker verwandten (Ziegler et al., 1998). Nach 24 Stunden exprimierten knapp 20% der Zellen den myeloiden Differenzierungsmarker CD11b. Cartee und Kollegen zeigten einen ähnlichen Anstieg von CD11b nach 24 Stunden unter vergleichbaren Zellkulturbedingungen (Cartee et al., 2001). Die Kontrollzellen wiesen zu keinem Zeitpunkt eine Expression von CD11b auf.

Der M-CSFR wird auf Zellen des mononukleären Phagozytensystems von der Vorläuferzelle bis zum Makrophagen exprimiert (Tushinski et al., 1982). In der durchgeführten PCR war der Rezeptor nach der Stimulation mit PMA kontinuierlich nachweisbar. Die Kontrollzellen zeigten zu keinem Zeitpunkt eine Expression des M-CSFR. Bestätigt wird diese Beobachtung durch Kogan und Kollegen (Kogan et al., 2012).

In der Pappenheimfärbung weisen Monozyten ein typisches Erscheinungsbild auf (Ostendorf und Seeber, 1997). Die in dieser Arbeit beobachteten morphologischen Veränderungen nach der Behandlung mit PMA stimmten mit diesem Erscheinungsbild überein. Die Zellen und die Zellkerne hatten eine irreguläre Kontur. Das Zytoplasma imponierte grau-blau und zeigte feine Granulationen. Die Kontrollzellen zeigten zu keinem Zeitpunkt sichtbare morphologische Veränderungen.

Übereinstimmend mit der Literatur zeigten die morphologischen und immunphänotypischen Veränderungen eine erfolgreiche Differenzierung der Zelllinie U-937 zu Monozyten / Makrophagen nach der Stimulation mit PMA. Neben der Bestätigung des U-937 Modells dienten die Experimente vorrangig als Basis für die nachfolgenden microRNA Expressionsanalysen. Der Anteil an CD11b⁺ Zellen nach 24

Stunden (ca. 20%) lies die Vermutung zu, dass sich die Zellen noch in der Differenzierung befinden, wohingegen die meisten Zellen nach 72 Stunden bereits differenziert / ausdifferenziert imponierten. Für die Microarrays wurden daher die Zeitpunkte 12, 24 und 48 Stunden ausgewählt. Die Microarrayanalyse nach 12 Stunden sollte diejenigen microRNAs ermitteln, die möglicherweise eine Differenzierung einleiten.

5.3. Hochregulation von miR-221 und miR-222 während der Differenzierung zu Monozyten / Makrophagen

Die microRNA Expressionsmuster variieren in den verschiedenen Gewebe- und Zelltypen, so auch im hämatopoetische System (Chen und Lodish, 2005; Kluiver et al., 2006). Der Zusammenhang zwischen den verschiedenen microRNAs und der Entstehung von hämatologischen und anderen Erkrankungen ist bisher noch nicht abschließend erforscht.

Microarrays haben sich in den letzten Jahren als eine gängige Methode bei der Erforschung von microRNAs erwiesen. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die globale bzw. differenzielle Expression von mehreren hundert microRNAs in nur einem Versuch untersucht werden kann. Des Weiteren ist, abhängig vom verwendeten Hersteller, in der Regel nur eine sehr geringe Menge RNA notwendig. Die Microarrays eignen sich somit optimal als Screeningmethode. Die bereits auf dem Array vorgesehene vierfache Bestimmung der einzelnen microRNAs ermöglicht das Auffinden von Artefakten. Potentielle Fehlerquellen sind die RNA-Degradierung während der Präparation, eine unspezifische Hybridisierung sowie eine schlechte RNA-Qualität. Die Validierung der Microarraydaten anhand alternativer Methoden ist empfehlenswert. Eine Möglichkeit zur Bestätigung von Microarrays sind quantitative Realtime-PCRs mit spezifischen Primern für jede microRNA (Skena et al., 1996; Liu et al., 2004; Kuhn et al., 2008).

Um die Expression der microRNAs während der monozytären Differenzierung zu untersuchen wurden U-937 Zellen mit PMA stimuliert. Anschließend wurde die microRNA Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten (12, 24 und 48 Stunden) analysiert. Zur Identifikation signifikant veränderter microRNAs wurden die Expressionsdaten der stimulierten Zellen (PMA) zu den Werten der Kontrolle (99% Ethanol) ins Verhältnis gesetzt. Die Arrays wurden zu U6-2 normalisiert.

Die Auswertung der drei Microarrays zeigte jeweils mehrere hoch- und herunterregulierte microRNAs. Die miR-155 zeigte nach 12 Stunden eine starke Hochregulation. In den anderen beiden Arrays war die miR-155 nicht signifikant verändert. Chen und Kollegen konnten ebenfalls eine Hochregulation von miR-155

während der Differenzierung zu Monozyten / Makrophagen zeigen. Diese Arbeitsgruppe verwendete das Differenzierungsmodell HL-60 + TPA nach 24 Stunden (Chen et al., 2008). Eine andere Arbeitsgruppe konnte im Versuchsmodell U-937 + PMA eine Runterregulation von miR-155 nach 24, 48 und 72 Stunden nachweisen (Gerloff et al., 2014). Die unterschiedlichen Ergebnisse sind am ehesten auf methodische Unterschiede zurückzuführen.

Mehrere Arbeitsgruppen haben die Hochregulation der miR-424 während der Differenzierung zu Monozyten / Makrophagen in CD34⁺ Stammzellen, HL-60, NB-4 und APL-Patientenproben beschrieben (Kasashima et al., 2004; Rosa et al., 2007). In den vorliegenden Experimenten konnte die Expression der miR-424 nicht konsistent nachgewiesen werden. Dieser Umstand kann auf die verschiedenen Zellen / Zelllinien zurückgeführt werden.

Lediglich vier microRNAs waren in allen drei Arrays als hochreguliert nachweisbar. Es handelte sich um die miR-21, miR-23a und das Cluster miR-221 / -222. Auf die miR-21 wurde in dieser Arbeit nicht näher eingegangen, da sie im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe untersucht wurde (Lehretz, 2014). Die miR-23a bildet einen Cluster mit miR-27a und miR-24-2. Die Arbeitsgruppe um Yu konnte nachweisen, dass die miR-23a und miR-27a bereits in unbehandelten U-937 hoch exprimiert vorliegen (Yu et al., 2006). Daher wurde von einer weiteren Analyse dieser microRNA abgesehen.

Insbesondere das microRNA-Cluster miR-221 / -222 zeichnete sich in den Microarrayanalysen nach 12 und 24 Stunden durch sehr hohe Expressionsunterschiede aus. Eine erhöhte Expression von miR-221 und miR-222 wurde bereits in mehreren soliden Tumoren (Ciafrè et al., 2005; Galardi et al., 2007; Visone et al., 2007; Felicetti et al., 2008) und in akuten myeloischen Leukämien (Dixon-McIver et al., 2008; Isken et al., 2008) gezeigt. In der Literatur finden sich eine Vielzahl von Untersuchungen zur Expression von miR-221 / -222. Allerdings beschäftigen sich nur wenige Arbeitsgruppen mit der Expression dieser beiden microRNAs während der Hämatopoese.

Korrelierend mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnten Sharbati und Kollegen die Hochregulation von miR-222 in der humanen monozytären Zelllinie THP-1 nach der Behandlung mit 250 ng/ml PMA zeigen (Sharbati et al., 2012). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte die Hochregulation von miR-221 / -222 nach der Stimulation mit 0,3 µM TPA in der Zelllinie HL-60 nachweisen (Chen et al., 2008). Im Gegensatz dazu zeigte sich während der Erythropoese und der terminalen Differenzierung von dendritischen Zellen eine Runterregulation von miR-221 / -222 (Felli et al., 2005) bzw. miR-221 (Lu et al., 2011). Die unterschiedlichen Expressionsmuster dieser beiden

microRNAs in den verschiedenen hämatopoetischen Zellen / Zelllinien sind noch nicht abschließend geklärt. Daher wurden zunächst diese beiden microRNAs für weitere Analysen ausgewählt.

Zur Validierung der Daten der Microarray Expressionsanalysen wurden die beiden microRNAs gezielt mehrfach mit qRT-PCRs analysiert. U-937 Zellen wurden erneut mit PMA stimuliert. Die anfertigten qRT-PCRs bestätigten die Hochregulation von miR-221 und miR-222 während der Differenzierung zu Monozyten / Makrophagen in U-937 Zellen. Eine nicht konstante Zelldichte während der Differenzierung ist möglicherweise verantwortlich für die große Streuung der Messwerte in den qRT-PCRs. Die größere Spannweite der relativen Expression von miR-221 / -222 in den quantitativen RT-PCRs könnte auch methodisch bedingt sein. Andere Arbeitsgruppen haben ebenfalls erhebliche Schwankungen in den Expressionswerten zwischen Microarray und qRT-PCR beobachtet (Choong et al., 2007; Chen et al., 2008).

5.4. Regulation von miR-221 / -222

Die funktionellen und regulatorischen Aspekte von miR-221 und miR-222 innerhalb der Hämatopoese bzw. des myeloiden Systems sind aktuell noch weitgehend unerforscht. Die Daten der Microarrays und qRT-PCRs deuteten auf eine entscheidende Rolle des microRNA-Cluster miR-221 / -222 während der Differenzierung zu Monozyten / Makrophagen hin. Um die komplexen Regulationsmechanismen zu klären, wurden weiterführende Versuche mit beiden microRNAs durchgeführt. Zunächst wurde die Grundexpression der beiden microRNAs in verschiedenen Zelllinien mittels qRT-PCRs analysiert. Neben überwiegend leukämischen Zelllinien wurden CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen und eine solide Karzinomzelllinie (PC-3) untersucht.

Frisch aufgetaute, nicht behandelte CD34⁺ Stammzellen wurden als nicht-maligne Referenz verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten CD34⁺ Stammzellen stammten aus Leukapherisaten der angegliederten onkologischen Abteilung (siehe Material und Methoden). Als Vorbereitung zur Leukapherese werden die Spender in der Regel mit dem Wachstumsfaktor G-CSF vorstimuliert (Hosing, 2012). Neuere Daten zeigen, dass die Auswirkungen einer Vorbehandlung mit G-CSF auf nachfolgende Experimente noch nicht abschließend analysiert sind (Becker, 2014). Bei weiterführenden Experimenten sollte dieser Aspekt daher berücksichtigt werden.

Die Prostatakarzinomzelllinie PC-3 zeigte eine höhere Expression von miR-221 und miR-222 gegenüber den CD34⁺ Stammzellen. Die erhöhte Expression dieser beiden microRNAs in PC-3 wurde bereits durch eine andere Arbeitsgruppen validiert (Galardi et al., 2007) und diente daher als positive Kontrolle. In der humanen CML-

Zelllinie K-562 konnte weder eine Expression von miR-221 noch von miR-222 nachgewiesen werden. Die Leukämiezelllinie HL-60 wies eine geringe Grundexpression von beiden microRNAs auf. Beide Ergebnisse korrelierten mit der Arbeit von Felli und Kollegen (Felli et al., 2005).

Neben PC-3 zeigte insbesondere die FLT3-ITD assoziierte Zelllinie MV4-11 eine erhöhte Expression von miR-221. Die erhöhte Expression von miR-221 in MV4-11 führte zu der Hypothese, dass die FLT3-ITD-Mutation hierfür verantwortlich sein könnte. FLT3-ITD-Mutationen finden sich gehäuft bei hämatologischen Erkrankungen und bei bis zu 20% der AML-Patienten (Nakao et al., 1996). Durch die FLT3-ITD-Mutation wird die Tyrosinkinasedomäne des FLT3-Rezeptors aktiviert, welches nachfolgend zur Autophosphorylierung des Rezeptors führt (Kiyoi et al., 1998). Als Folge dieser Autophosphorylierung kommt es unter anderem zur Blockade der myeloiden Differenzierung (Zheng et al., 2004).

Um zu testen, ob die FLT3-ITD-Mutation Auswirkungen auf die Expression von miR-221 oder miR-222 hat, wurde die Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors mit verschiedenen Proteinkinaseinhibitoren gehemmt. Nach der Behandlung mit PKC412 bzw. SU5614 wurden Western Blots angefertigt. Im Gegensatz zur Kontrolle (DMSO) zeigte sich nach der PKI-Behandlung keine Phosphorylierung von STAT5. Verschiedene Arbeitsgruppen bestätigen die Effektivität der PKI (Yee et al., 2002; Grundler et al., 2003). Parallel durchgeführte quantitative RT-PCRs zeigten eine verminderte Expression von miR-221 und miR-222 in MV4-11 nach der Behandlung mit den beiden PKI.

Zur weiteren Analyse der Regulation von miR-221 und miR-222 wurde FLT3-ITD bzw. FLT3-WT (Kontrolle) in der Zelllinie U-937 überexprimiert. Anschließend wurde die Expression der beiden microRNAs mittels qRT-PCRs gemessen. Entgegen der Hypothese konnte keine Induktion des miR-221 / -222 Clusters nach der Überexpression von FLT3-ITD in U-937 gezeigt werden. Unter vergleichbaren Zellkulturbedingungen konnten Gerloff und Kollegen die Regulation der miR-155 über den FLT3-ITD-Signalweg bestätigen (Gerloff et al., 2014). Im Gegensatz zur miR-155 scheint die Regulation von miR-221 / -222 nicht über den FLT3-ITD-Signalweg stattzufinden.

Da die verwendeten Proteinkinaseinhibitoren (PKC412 und SU5614) keine spezifischen FLT3-ITD-Inhibitoren sind, ist die Runterregulation von miR-221 / -222 möglicherweise Folge der Hemmung einer anderen Kinase. Die beiden PKI hemmen unter anderem PKC, SYK, VEGFR (Weisberg et al., 2002), KIT und PDGFR (Krystal et al., 2001; Yee et al., 2002).

5.5. P27^{Kip1} ist ein Ziel von miR-221 / -222

Neben der Analyse der Regulationsmechanismen von miR-221 und miR-222 lag ein weiterer Fokus dieser Arbeit auf der Identifizierung eines potentiellen Ziels dieser beiden microRNAs. Mittels frei verfügbarer Programme und Datenbanken konnte p27^{Kip1}, ein bekannter Zellzyklushemmer und Tumorsuppressor, als putatives Ziel des Clusters miR-221 / -222 ermittelt werden (www.targetscan.org, Version 6.2). P27^{Kip1} bindet sich an cyclin-abhängige Kinasen und verhindert deren Aktivierung. In verschiedenen malignen Erkrankungen findet sich eine verminderte oder fehlende Expression von p27^{Kip1}, welches mit einer erhöhten Zellzyklusprogression, einem höheren Tumorstadium und einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Tsihlias et al., 1999; Visone et al., 2007; Nassirpour et al., 2013). Es ergab sich daher die Hypothese, dass sich die Grundexpression von p27^{Kip1} zwischen normalen Zellen und leukämischen Zelllinien deutlich unterscheiden müsste.

Zur Charakterisierung der Grundexpression von p27^{Kip1} wurde das Proteinlevel in den verschiedenen Zelllinien mittels Western Blot untersucht. Frisch aufgetaute CD34⁺ Stammzellen zeigten eine geringe Grundexpression von p27^{Kip1}. Dieses Ergebnis korreliert mit der Arbeit von Yaroslavskiy und Kollegen (Yaroslavskiy et al., 1999). Die Grundexpression von p27^{Kip1} variierte stark zwischen den untersuchten Zelllinien. Die höchste Expression wiesen U-937 und K-562 Zellen auf. Die geringste Expression von p27^{Kip1} lies sich in der Zelllinie HL-60 nachweisen. Die Expression von p27^{Kip1} in PC-3 und U-937 konnte auch durch andere Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (Cartee et al., 2001; Galardi et al., 2007).

Darüber hinaus sollte betrachtet werden, ob eine Korrelation zwischen der Expression von miR-221 / -222 und dem Level von p27^{Kip1} vorliegt. In dieser Arbeit konnte keine Korrelation zwischen der Grundexpression von p27^{Kip1} und der Expression von miR-221 / -222 in den verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass p27^{Kip1} in den verschiedenen Zelllinien durch unterschiedliche Mechanismen reguliert wurde. Im Gegensatz dazu zeigt sich im papillärem Schilddrüsenkarzinom, im Mammakarzinom und bei chronisch lymphatischen Leukämien eine inverse Korrelation zwischen p27^{Kip1} und der relativen Expression von miR-221 / -222 (Visone et al., 2007; Frenquelli et al., 2010; Nassirpour et al., 2013).

Die Expression von p27^{Kip1} wird in verschiedenen soliden Tumoren und CLL nachweislich durch miR-221 / -222 reguliert (Galardi et al., 2007; Gillies und Lorimer, 2007; Visone et al., 2007; Felicetti et al., 2008; Frenquelli et al., 2010; Nassirpour et al., 2013). Die Bestätigung von p27^{Kip1} als Ziel des Clusters miR-221 / -222 in AML steht

noch aus. Um p27^{Kip1} als Ziel von miR-221 / -222 in MV4-11 Zellen zu bestätigen wurden LNA Knockdown Experimente durchgeführt. Die effektive und sequenzspezifische Gegenstranghemmung des LNA Knockdowns kann zur Bestätigung der biologischen Funktion von microRNAs herangezogen werden (Orom et al., 2006). Nach 24 Stunden hatte weder die selektive Transfektion von LNA-221, noch von LNA-222 einen Effekt auf das Proteinlevel von p27^{Kip1} in MV4-11 Zellen. Wurden jedoch beide LNA zusammen transfiziert, zeigte sich eine signifikante Erhöhung des p27^{Kip1} Proteinlevels in der FLT3-ITD assoziierten Zelllinie MV4-11.

Da miR-221 und miR-222 einem Gencluster mit identischen Bindesequenzen angehören, ist der fehlende Effekt von LNA-221 bzw. LNA-222 möglicherweise dadurch bedingt, dass die zweite microRNA den Verlust ausgleicht. Die Ergebnisse könnten auch auf einen synergetischen Effekt von miR-221 und miR-222 hindeuten. Die Untersuchung dieses synergetischen Effektes und deren Auswirkungen müssen noch näher untersucht werden. Da co-exprimierte microRNAs möglicherweise ein funktionelles Verhältnis teilen, ist die Zusammenarbeit dieser beiden microRNAs höchstwahrscheinlich für die Feinregulation der Gen- und Proteinexpression verantwortlich (Bartel, 2004). Die Kontrollmechanismen, welche für die Expression von co-exprimierten microRNAs verantwortlich sind, wurden noch nicht vollständig untersucht.

5.6. Perspektiven

Gesunde Zellen, hämatologische Erkrankungen und solide Tumore zeigen unterschiedliche microRNA Expressionsmuster (Garzon et al., 2006). Mehrere Studien zeigen eine Korrelation zwischen der microRNA Expression und klinischen bzw. prognostischen Parametern (Esquela-Kerscher und Slack, 2006; Cai et al., 2015). Da die jeweiligen microRNA Expressionsmuster und die untersuchten Erkrankungen hochspezifisch sind, besteht die Möglichkeit die microRNAs als ein neues diagnostisches und prognostisches Mittel einzusetzen. Bereits heute ist es möglich, verschiedene CLL-Verläufe anhand ihrer microRNA Expressionsmuster zu unterscheiden (Calin et al., 2005). Neuere Studien zeigen die Möglichkeit das Plasmalevel von miR-221 als Marker des prä- und postoperativen Monitoring beim Larynxkarzinom zu verwenden (Yilmaz et al., 2015).

Neben den diagnostischen Möglichkeiten sollten sich in der näheren Zukunft auch therapeutische Optionen durch die Erforschung der microRNAs, sowie ihrer Ziele und deren Regulationsmechanismen ergeben. Allerdings muss zunächst geklärt werden, ob die jeweils gefundenen Veränderungen der microRNA Expression auch ursächlich für das Auftreten der Erkrankung sind. Gegenstand der aktuellen Forschung

ist der Grundgedanke microRNAs als Therapieansatz oder zusätzliche Therapieoption zu ermöglichen, da microRNAs sowohl als Onkogene und auch als Tumorsuppressor wirken können (Esquela-Kerscher und Slack, 2006).

In vielen malignen Erkrankungen findet sich eine verminderte microRNA Expression, daher ist hier die Induktion dieser microRNAs geplant, um die fehlende Tumorsuppression wieder herzustellen. Eine zweite Variante ist die gezielte Inhibierung von einzelnen onkogenen microRNAs zur Normalisierung der microRNA Expressionslevel. Eine microRNA spezifische Hemmung ist unter anderem durch LNA möglich. Viel versprechende klinische Studien mit speziellen LNA werden bereits bei Hepatitis C Infektionen durchgeführt (Janssen et al., 2013). Erste präklinische *in vivo* Versuche bei Mäusen zeigen die erfolgreiche Verwendung von LNA-i-miR-221 beim Multiplem Myelom (Di Martino et al., 2014). Eine weitere Möglichkeit microRNAs als therapeutisches Mittel zu verwenden, besteht darin, durch diese die Ansprechbarkeit eines anderen Medikamentes zu verändern. Der Knockdown von miR-221 / -222 in Mammakarzinomzelllinien führt zu einer Tamoxifen-induzierten Hemmung des Zellwachstums und zur Apoptose (Zhao et al., 2008).

Die Wirkung von microRNAs spielt sich klassischerweise auf posttranskriptioneller Ebene ab und wird über eine Sequenz in der 3'UTR der Ziel-mRNA vermittelt. Ein gängiges Experiment zur Verifizierung dieser Mechanismen erfolgt über Luciferase-Assays. Die negative regulatorische Wirkung einer microRNA spiegelt sich in diesem Experiment in der Reduktion der Luziferaseaktivität wider und eignet sich somit als weiterführendes Experiment. Des Weiteren wäre eine gezielte Überexpression der zu untersuchenden microRNA mittels microRNA-mimics zu erwägen.

Da p27^{Kip1} unter anderem einen hemmenden Effekt auf den Zellzyklus hat, eignen sich insbesondere Zellzyklusanalysen, colony-forming assays und Wachstumskurven als weiterführende Experimente. Ferner sollte die Expression von p27^{Kip1} während der Differenzierung von U-937 zu Monozyten / Makrophagen bestimmt werden. Yaroslavskiy und Kollegen konnten eine Zunahme von p27^{Kip1} während der monozytären Differenzierung von CD34⁺ Stammzellen nachweisen (Yaroslavskiy et al., 1999).

6. Zusammenfassung

MicroRNAs sind kleine, nicht-kodierende RNAs, die in eine Vielzahl von biologischen Prozessen involviert sind. In dieser Arbeit konnte, mit Hilfe von microRNA Expressionsanalysen und qRT-PCRs, die erhöhte Expression des microRNA-Clusters miR-221 / -222 während der Differenzierung von U-937 Zellen zu Monozyten / Makrophagen nach der Stimulation mit PMA gezeigt werden.

Die Literaturrecherche ergab eine erhöhte Expression des microRNA-Clusters miR-221 / -222 in diversen soliden Karzinomen und AML-Patientenproben. Zur weiteren Befundeinordnung wurden verschiedene, überwiegend hämatopoetische Zelllinien auf die Grundexpression dieser beiden microRNAs untersucht. Hierbei zeigte sich eine erhöhte Expression von miR-221 in der FLT3-ITD assoziierten Zelllinie MV4-11. FLT3-ITD-Mutationen treten gehäuft bei hämatologischen Erkrankungen auf. Die funktionellen und regulatorischen Aspekte von miR-221 / -222 innerhalb des myeloiden Systems sind aktuell noch weitgehend unklar. Daher wurden zunächst Experimente mit speziellen Proteinkinaseinhibitoren und der FLT3-Rezeptortyrosinkinase zur Überprüfung der Regulationsmechanismen durchgeführt. Die Expression von miR-221 und miR-222 wird durch Proteinkinaseinhibitoren vermindert. Eine Regulation von miR-221 / -222 über den FLT3-ITD-Signalweg konnte in dieser Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden.

P27^{Kip1}, ein bekannter Zellzyklushemmer und Tumorsuppressor, ist in mehreren soliden Karzinomen ein bestätigtes Ziel von miR-221 / -222. Ferner zeigt sich in verschiedenen soliden Karzinomen und chronisch lymphatischen Leukämien eine inverse Korrelation zwischen p27^{Kip1} und der Expression von miR-221 / -222. Die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien und CD34⁺ Stammzellen zeigten keine inverse Korrelation zwischen p27^{Kip1} und miR-221 / -222.

Die Ergebnisse der LNA Knockdown Experimente deuten darauf hin, dass p27^{Kip1} in der AML-Zelllinie MV4-11 ebenfalls ein direktes Ziel von miR-221 / -222 ist. Des Weiteren deuten die Daten dieser Arbeit auf einen synergetischen Effekt von miR-221 und miR-222 hin. Weiterführende Experimente zur Erforschung der Regulationsmechanismen von miR-221 / -222 sowie deren Funktionen in der Monopoese und Leukämie sind notwendig.

Literaturverzeichnis

- Akashi K, Traver D, Miyamoto T und Weissman IL (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404:193-7.
- Appelbaum FR, Rowe JM, Radich J und Dick JE (2001) Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 62-86.
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-97.
- Bartelmez SH, Sacca R und Stanley ER (1985) Lineage specific receptors used to identify a growth factor for developmentally early hemopoietic cells: assay of hemopoietin-2. *J Cell Physiol* 122:362-9.
- Becker PS (2014) Optimizing stem cell mobilization: lessons learned. *J Natl Compr Canc Netw* 12:1443-9.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR und Sultan C (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33:451-8.
- Blume-Jensen P und Hunter T (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411:355-65.
- Byrne PV, Guilbert LJ und Stanley ER (1981) Distribution of cells bearing receptors for a colony-stimulating factor (CSF-1) in murine tissues. *J Cell Biol* 91:848-53.
- Cai K, Shen F, Cui JH, Yu Y und Pan HQ (2015) Expression of miR-221 in colon cancer correlates with prognosis. *Int J Clin Exp Med* 8:2794-8.
- Calin GA und Croce CM (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6:857-66.
- Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M und Croce CM (2005) A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 353:1793-801.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M und Croce CM (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2999-3004.
- Cartee L, Wang Z, Decker RH, Chellappan SP, Fusaro G, Hirsch KG, Sankala HM, Dent P und Grant S (2001) The cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) flavopiridol disrupts phorbol 12-myristate 13-acetate-induced differentiation and CDKI expression while enhancing apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Cancer Res* 61:2583-91.
- Chen A, Luo M, Yuan G, Yu J, Deng T, Zhang L, Zhou Y, Mitchelson K und Cheng J (2008) Complementary analysis of microRNA and mRNA expression during phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA)-induced differentiation of HL-60 cells. *Biotechnol Lett* 30:2045-52.
- Chen CZ, Li L, Lodish HF und Bartel DP (2004) MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303:83-6.
- Chen CZ und Lodish HF (2005) MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. *Semin Immunol* 17:155-65.

- Cheng AM, Byrom MW, Shelton J und Ford LP (2005) Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res* 33:1290-7.
- Cho WC (2007) OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer* 6:60.
- Choong ML, Yang HH und McNiece I (2007) MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis. *Exp Hematol* 35:551-64.
- Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM und Farace MG (2005) Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 334:1351-8.
- Cohen PE, Nishimura K, Zhu L und Pollard JW (1999) Macrophages: important accessory cells for reproductive function. *J Leukoc Biol* 66:765-72.
- Croce CM (2008) Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 358:502-11.
- Di Martino MT, Gulla A, Gallo Cantafio ME, Altomare E, Amodio N, Leone E, Morelli E, Lio SG, Caracciolo D, Rossi M, Frandsen NM, Tagliaferri P und Tassone P (2014) In vitro and in vivo activity of a novel locked nucleic acid (LNA)-inhibitor-miR-221 against multiple myeloma cells. *PLoS One* 9:e89659.
- Dixon-Mclver A, East P, Mein CA, Cazier JB, Molloy G, Chaplin T, Andrew Lister T, Young BD und Debernardi S (2008) Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia. *PLoS One* 3:e2141.
- Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, Lund E und Dahlberg JE (2005) Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3627-32.
- Esquela-Kerscher A und Slack FJ (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:259-69.
- Felicetti F, Errico MC, Segnalini P, Mattia G und Care A (2008) MicroRNA-221 and -222 pathway controls melanoma progression. *Expert Rev Anticancer Ther* 8:1759-65.
- Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F, Liuzzi F, Lulli V, Morsilli O, Santoro S, Valtieri M, Calin GA, Liu CG, Sorrentino A, Croce CM und Peschle C (2005) MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18081-6.
- Frenquelli M, Muzio M, Scielzo C, Fazi C, Scarfo L, Rossi C, Ferrari G, Ghia P und Caligaris-Cappio F (2010) MicroRNA and proliferation control in chronic lymphocytic leukemia: functional relationship between miR-221/222 cluster and p27. *Blood* 115:3949-59.
- Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, Massalini S, Frajese GV, Ciafre SA und Farace MG (2007) miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J Biol Chem* 282:23716-24.
- Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, Iuliano R, Cimmino A, Aqeilan R, Volinia S, Bhatt D, Alder H, Marcucci G, Calin GA, Liu CG, Bloomfield CD, Andreeff M und Croce CM (2006) MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5078-83.
- Georgantas RW, Hildreth R, Morisot S, Alder J, Liu CG, Heimfeld S, Calin GA, Croce CM und Civin CI (2007) CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA

- expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2750-5.
- Gerloff D, Grundler R, Wurm AA, Brauer-Hartmann D, Katzerke C, Hartmann JU, Madan V, Müller-Tidow C, Duyster J, Tenen DG, Niederwieser D und Behre G (2014) NF-kappaB/STAT5/miR-155 network targets PU.1 in FLT3-ITD-driven acute myeloid leukemia. *Leukemia* 29:535-47.
- Gillies JK und Lorimer IA (2007) Regulation of p27Kip1 by miRNA 221/222 in glioblastoma. *Cell Cycle* 6:2005-9.
- Gilliland DG und Griffin JD (2002) The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 100:1532-42.
- Grage-Griebenow E, Flad HD und Ernst M (2001) Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* 69:11-20.
- Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A und Goldstone A (1998) The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 92:2322-33.
- Grundler R, Thiede C, Miething C, Steudel C, Peschel C und Duyster J (2003) Sensitivity toward tyrosine kinase inhibitors varies between different activating mutations of the FLT3 receptor. *Blood* 102:646-51.
- Guilbert LJ und Stanley ER (1980) Specific interaction of murine colony-stimulating factor with mononuclear phagocytic cells. *J Cell Biol* 85:153-9.
- Haferlach T und Schoch C (2002) [WHO classification of acute myeloid leukaemia (AML) and the myelodysplastic syndrome (MDS)]. *Dtsch Med Wochenschr* 127:447-50.
- Hass R, Bartels H, Topley N, Hadam M, Kohler L, Goppelt-Strube M und Resch K (1989) TPA-induced differentiation and adhesion of U937 cells: changes in ultrastructure, cytoskeletal organization and expression of cell surface antigens. *Eur J Cell Biol* 48:282-93.
- Hosing C (2012) Hematopoietic stem cell mobilization with G-CSF. *Methods Mol Biol* 904:37-47.
- Hutvagner G und Zamore PD (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297:2056-60.
- Isken F, Steffen B, Merk S, Dugas M, Markus B, Tidow N, Zuhlsdorf M, Illmer T, Thiede C, Berdel WE, Serve H und Muller-Tidow C (2008) Identification of acute myeloid leukaemia associated microRNA expression patterns. *Br J Haematol* 140:153-61.
- Iwasaki H, Mizuno S, Arinobu Y, Ozawa H, Mori Y, Shigematsu H, Takatsu K, Tenen DG und Akashi K (2006) The order of expression of transcription factors directs hierarchical specification of hematopoietic lineages. *Genes Dev* 20:3010-21.
- Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, van der Meer AJ, Patick AK, Chen A, Zhou Y, Persson R, King BD, Kauppinen S, Levin AA und Hodges MR (2013) Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* 368:1685-94.
- Karp X und Ambros V (2005) Developmental biology. Encountering microRNAs in cell fate signaling. *Science* 310:1288-9.

- Kasashima K, Nakamura Y und Kozu T (2004) Altered expression profiles of microRNAs during TPA-induced differentiation of HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 322:403-10.
- Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H und Naoe T (1998) Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* 12:1333-7.
- Kluiver J, Kroesen BJ, Poppema S und van den Berg A (2006) The role of microRNAs in normal hematopoiesis and hematopoietic malignancies. *Leukemia* 20:1931-6.
- Koff A (2006) How to decrease p27Kip1 levels during tumor development. *Cancer Cell* 9:75-6.
- Kogan M, Fischer-Smith T, Kaminsky R, Lehmicke G und Rappaport J (2012) CSF-1R up-regulation is associated with response to pharmacotherapy targeting tyrosine kinase activity in AML cell lines. *Anticancer Res* 32:893-9.
- Kondo M, Weissman IL und Akashi K (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91:661-72.
- Kozomara A und Griffiths-Jones S (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Researc* 42:D68–D73.
- Krause DS, Ito T, Fackler MJ, Smith OM, Collector MI, Sharkis SJ und May WS (1994) Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 84:691-701.
- Krystal GW, Honsawek S, Kiewlich D, Liang C, Vasile S, Sun L, McMahon G und Lipson KE (2001) Indolinone tyrosine kinase inhibitors block Kit activation and growth of small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 61:3660-8.
- Kuhn DE, Martin MM, Feldman DS, Terry AV, Jr., Nuovo GJ und Elton TS (2008) Experimental validation of miRNA targets. *Methods* 44:47-54.
- le Sage C, Nagel R, Egan DA, Schrier M, Mesman E, Mangiola A, Anile C, Maira G, Mercatelli N, Ciafre SA, Farace MG und Agami R (2007) Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *EMBO J* 26:3699-708.
- Lee RC, Feinbaum RL und Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-54.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S und Kim VN (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425:415-9.
- Lehretz M. 2014. Funktionelle und regulatorische Analysen zur miR-21 im myeloiden Differenzierungsmodell U937 [Dissertation]. Halle (Saale): Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Lewis BP, Burge CB und Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120:15-20.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP und Burge CB (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115:787-98.
- Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamlieil N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M und Croce CM (2004) An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9740-4.

- Look AT (1997) Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278:1059-64.
- Lowenberg B, Downing JR und Burnett A (1999) Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 341:1051-62.
- Lu C, Huang X, Zhang X, Roensch K, Cao Q, Nakayama KI, Blazar BR, Zeng Y und Zhou X (2011) miR-221 and miR-155 regulate human dendritic cell development, apoptosis, and IL-12 production through targeting of p27kip1, KPC1, and SOCS-1. *Blood* 117:4293-303.
- Lyman SD und Jacobsen SE (1998) c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 91:1101-34.
- MacDonald KP, Rowe V, Bofinger HM, Thomas R, Sasmono T, Hume DA und Hill GR (2005) The colony-stimulating factor 1 receptor is expressed on dendritic cells during differentiation and regulates their expansion. *J Immunol* 175:1399-405.
- Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL und Akashi K (2001) Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97:3333-41.
- Medina R, Zaidi SK, Liu CG, Stein JL, van Wijnen AJ, Croce CM und Stein GS (2008) MicroRNAs 221 and 222 bypass quiescence and compromise cell survival. *Cancer Res* 68:2773-80.
- Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S und Borkhardt A (2004) High expression of precursor microRNA-155/*BIC* RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 39:167–169.
- Mitelman F, Johansson B und Mertens F (2007) The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* 7:233-45.
- Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T und Misawa S (1996) Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 10:1911-8.
- Nassirpour R, Mehta PP, Baxi SM und Yin MJ (2013) miR-221 promotes tumorigenesis in human triple negative breast cancer cells. *PLoS One* 8:e62170.
- Ogawa M (1993) Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81:2844-53.
- Orom UA, Kauppinen S und Lund AH (2006) LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function. *Gene* 372:137-41.
- Ostendorf PC und Seeber S: *Hämatologie, Onkologie*. Urban & Fischer, München, 1997, S. 24-32.
- Pedrinaci S, Ruiz-Cabello F, Gomez O, Collado A und Garrido F (1990) Protein kinase C-mediated regulation of the expression of CD14 and CD11/CD18 in U937 cells. *Int J Cancer* 45:294-8.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Ramkissoon SH, Mainwaring LA, Ogasawara Y, Keyvanfar K, McCoy JP, Jr., Sloan EM, Kajigaya S und Young NS (2006) Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. *Leuk Res* 30:643-7.
- Renz-Polster H, Krautzig S und Braun J: *Basislehrbuch Innere Medizin*. 3. Auflage Elsevier Urban & Fischer, München, 2004, S. 297-318.
- Roodman GD (1996) Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* 17:308-32.
- Rosa A, Ballarino M, Sorrentino A, Sthandier O, De Angelis FG, Marchioni M, Masella B, Guarini A, Fatica A, Peschle C und Bozzoni I (2007) The interplay between

- the master transcription factor PU.1 and miR-424 regulates human monocyte/macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19849-54.
- Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO und Davis RW (1996) Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10614-9.
- Schoch C, Kern W, Kohlmann A, Hiddemann W, Schnittger S und Haferlach T (2005) Acute myeloid leukemia with a complex aberrant karyotype is a distinct biological entity characterized by genomic imbalances and a specific gene expression profile. *Genes Chromosomes Cancer* 43:227-38.
- Sengupta A, Liu WK, Yeung YG, Yeung DC, Frackelton AR, Jr. und Stanley ER (1988) Identification and subcellular localization of proteins that are rapidly phosphorylated in tyrosine in response to colony-stimulating factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8062-6.
- Sharbati S, Sharbati J, Hoeke L, Bohmer M und Einspanier R (2012) Quantification and accurate normalisation of small RNAs through new custom RT-qPCR arrays demonstrates Salmonella-induced microRNAs in human monocytes. *BMC Genomics* 13:23.
- Shivdasani RA (2006) MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood* 108:3646-53.
- Sundstrom C und Nilsson K (1976) Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 17:565-77.
- Tabasi SA und Erson AE (2008) MIR221 (microRNA 221). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 13 (8):566-569.
- Tenen DG, Hromas R, Licht JD und Zhang DE (1997) Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* 90:489-519.
- Trowbridge IS und Thomas ML (1994) CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 12:85-116.
- Tsihlias J, Kapusta L und Slingerland J (1999) The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu Rev Med* 50:401-23.
- Tushinski RJ, Oliver IT, Guilbert LJ, Tynan PW, Warner JR und Stanley ER (1982) Survival of mononuclear phagocytes depends on a lineage-specific growth factor that the differentiated cells selectively destroy. *Cell* 28:71-81.
- Valledor AF, Borrás FE, Culléll-Young M und Celada A (1998) Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *J Leukoc Biol* 63:405-17.
- Visone R, Russo L, Pallante P, De Martino I, Ferraro A, Leone V, Borbone E, Petrocca F, Alder H, Croce CM und Fusco A (2007) MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. *Endocr Relat Cancer* 14:791-8.
- Weisberg E, Boulton C, Kelly LM, Manley P, Fabbro D, Meyer T, Gilliland DG und Griffin JD (2002) Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell* 1:433-43.
- Wienholds E und Plasterk RH (2005) MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett* 579:5911-22.
- www.targetscan.org. TargetScanHuman [Internet] Version 6.2, Juni 2012, letzter Aufruf: Januar 2016. Verfügbar auf: http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_61/targetscan.cgi?species=Human&gid=&mir_sc=&mir_c=&mir_nc=&mirg=hsa-miR-221

- www.targetscan.org. HumanCDKN1B [Internet] Version 7.1, Juni 2016, letzter Aufruf: Juni 2015. Verfügbar auf: http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_71/view_gene.cgi?rs=ENST00000228872.4&taxid=9606&members=miR-221-3p/222-3p&showcnc=0&shownc=0&subset=1
- Xu P, Guo M und Hay BA (2004) MicroRNAs and the regulation of cell death. *Trends Genet* 20:617-24.
- Yaroslavskiy B, Watkins S, Donnenberg AD, Patton TJ und Steinman RA (1999) Subcellular and cell-cycle expression profiles of CDK-inhibitors in normal differentiating myeloid cells. *Blood* 93:2907-17.
- Yee KW, O'Farrell AM, Smolich BD, Cherrington JM, McMahon G, Wait CL, McGreevey LS, Griffith DJ und Heinrich MC (2002) SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase. *Blood* 100:2941-9.
- Yeung YG, Jubinsky PT, Sengupta A, Yeung DC und Stanley ER (1987) Purification of the colony-stimulating factor 1 receptor and demonstration of its tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:1268-71.
- Yi R, Qin Y, Macara IG und Cullen BR (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17:3011-6.
- Yilmaz SS, Guzel E, Karatas OF, Yilmaz M, Creighton CJ und Ozen M (2015) MiR-221 as a pre- and postoperative plasma biomarker for larynx cancer patients. *Laryngoscope* 125:E377-81.
- Yu J, Wang F, Yang GH, Wang FL, Ma YN, Du ZW und Zhang JW (2006) Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 349:59-68.
- Zhao JJ, Lin J, Yang H, Kong W, He L, Ma X, Coppola D und Cheng JQ (2008) MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. *J Biol Chem* 283:31079-86.
- Zheng R, Friedman AD, Levis M, Li L, Weir EG und Small D (2004) Internal tandem duplication mutation of FLT3 blocks myeloid differentiation through suppression of C/EBPalpha expression. *Blood* 103:1883-90.
- Ziegler B, Testa U, Condorelli G, Vitelli L, Valtieri M und Peschle C (1998) Unilineage hematopoietic differentiation in bulk and single cell culture. *Stem Cells* 16 Suppl 1:51-73.
- Zwick E, Bange J und Ullrich A (2001) Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocr Relat Cancer* 8:161-73.

Thesen

1. PMA induziert die Differenzierung der Zelllinie U-937 zu Monozyten / Makrophagen.
2. Der Oberflächenmarker CD11b, Zellfärbungen nach Pappenheim und der M-CSFR können als Marker für eine erfolgreiche myeloide Differenzierung verwendet werden.
3. Während der Monopoese kommt es zu Veränderungen der microRNA Expression.
4. Die miR-21, miR-23a und miR-221 / -222 sind während der Differenzierung zu Monozyten / Makrophagen dauerhaft hochreguliert.
5. Gesunde Zellen und leukämische Zellen zeigen eine unterschiedliche Expression von miR-221 / -222.
6. In der FLT3-ITD assoziierten Zelllinie MV4-11 zeigt sich eine erhöhte Expression von miR-221.
7. PKI hemmen die Expression von miR-221 / -222 in der Zelllinie MV4-11.
8. Die Überexpression von FLT3-ITD in der Zelllinie U-937 führt nicht zur Induktion von miR-221 / -222.
9. Die Expression von p27^{Kip1} variiert zwischen CD34⁺ Stammzellen, leukämischen Zellen und soliden Karzinomen.
10. P27^{Kip1} ist ein Ziel von miR-221 / -222 in der Zelllinie MV4-11.

Anlagen (Tabellen)

Tabelle 5: MicroRNA Expression in U-937 nach 10 nM PMA nach 12 Stunden. Dargestellt sind Ratio (PMA / Ethanol), Standardabweichung und p-Wert.

Name	ID	Ratio (PMA/Ethanol)	Standardabweichung	p-Wert
U6-snRNA-2	11279	1.00	± 0.04	9.9 x 10 ⁻⁰¹
hsa-let-7a	17748	1.65	± 0.43	5.4 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-15b	17280	2.08	± 0.46	9.8 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-16	10967	1.69	± 0.19	2.5 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-20a	10999	2.14	± 0.25	2.4 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-21	5740	3.39	± 0.70	1.2 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-23a	11026	1.52	± 0.23	1.2 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-24	17506	4.32	± 1.28	5.3 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-27a	19593	2.74	± 0.37	2.9 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-29a	11039	2.45	± 0.44	2.7 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-29c	11041	1.82	± 0.29	2.3 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-98	11182	2.49	± 0.62	3.3 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-100	19581	1.96	± 0.48	3.6 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-129-5p	10934	1.86	± 0.15	9.8 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-132	10937	2.06	± 0.77	2.2 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-142-5p	19015	1.63	± 0.10	2.7 x 10 ⁻⁰⁶
hsa-miR-155	10964	6.57	± 2.50	1.4 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-183	10977	1.87	± 0.53	1.6 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-221	11022	3.19	± 0.82	2.8 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-222	11023	6.61	± 2.40	1.1 x 10 ⁻⁰¹
hsa-miR-370	11082	2.21	± 0.67	9.4 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-411	17482	2.38	± 0.86	3.8 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-483-3p	13180	2.31	± 0.31	1.8 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-518e*/519a*/519b-5p/519c-5p/522*/523*	13137	2.87	± 1.13	3.3 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-519e*	13132	2.80	± 0.95	3.7 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-587	17594	4.18	± 2.08	2.1 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-625	17573	2.12	± 0.58	5.2 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-652	17281	2.97	± 1.46	4.7 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-671-5p	17939	2.83	± 0.58	7.4 x 10 ⁻⁰³
hsa-let-7e	17751	0.18	± 0.18	2.7 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-30d	19596	0.17	± 0.14	7.5 x 10 ⁻⁰⁵
hsa-miR-299-5p	11038	0.31	± 0.26	2.8 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-302a	11222	0.26	± 0.15	1.0 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-326	11059	0.11	± 0.10	4.9 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-453	11117	0.27	± 0.15	2.0 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-525-5p	11175	0.52	± 0.08	9.1 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-559	14755	0.52	± 0.11	5.7 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-592	17312	0.13	± 0.05	1.1 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-642	17305	0.39	± 0.28	2.2 x 10 ⁻⁰²

Tabelle 6: MicroRNA Expression in U-937 nach 10 nM PMA nach 24 Stunden. Dargestellt sind Ratio (PMA / Ethanol), Standardabweichung und p-Wert.

Name	ID	Ratio (PMA/Ethanol)	Standardabweichung	p-Wert
U6-snRNA-2	11279	1,01	± 0,12	9,9 x 10 ⁻⁰¹
hsa-miR-21	5740	2,97	± 1,15	1,5 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-23a	11026	1,55	± 0,12	3,0 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-221	11022	3,73	± 0,51	1,5 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-222	11023	5,25	± 0,45	6,1 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-612	17346	1,58	± 0,08	1,8 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-18a	10983	0,40	± 0,08	3,7 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-18b	13141	0,36	± 0,10	1,7 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-19a	10997	0,38	± 0,06	3,4 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-20a	11008	0,48	± 0,03	7,2 x 10 ⁻⁰⁵
hsa-miR-124	14328	0,26	± 0,10	8,0 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-142-3p	10947	0,49	± 0,01	1,9 x 10 ⁻¹¹
hsa-miR-185	5560	0,34	± 0,02	2,9 x 10 ⁻⁰⁶
hsa-miR-199a-5p	19590	0,53	± 0,13	1,1 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-210	13511	0,35	± 0,20	1,0 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-218	11018	0,21	± 0,11	4,2 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-326	11059	0,11	± 0,02	2,5 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-361-5p	14301	0,33	± 0,11	1,5 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-375	11088	0,40	± 0,13	1,9 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-378	11105	0,48	± 0,14	5,1 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-382	11097	0,37	± 0,06	1,5 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-451	11248	0,28	± 0,19	1,2 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-494	14287	0,33	± 0,03	6,6 x 10 ⁻⁰⁵
hsa-miR-503	11135	0,37	± 0,12	7,7 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-515-5p	11149	0,29	± 0,12	1,2 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-518c*	13131	0,27	± 0,06	4,7 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-542-3p	14315	0,09	± 0,08	1,8 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-583	17295	0,16	± 0,05	9,4 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-593*	17564	0,43	± 0,08	5,2 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-617	17552	0,25	± 0,13	1,4 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-628-3p	17471	0,30	± 0,19	8,4 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-642	17305	0,34	± 0,06	3,9 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-769-3p	17809	0,38	± 0,26	3,3 x 10 ⁻⁰²

Tabelle 7: MicroRNA Expression in U-937 nach 10 nM PMA nach 48 Stunden. Dargestellt sind Ratio (PMA / Ethanol), Standardabweichung und p-Wert.

Name	ID	Ratio (PMA/Ethanol)	Standardabweichung	p-Wert
U6-snRNA-2	11279	1.00	± 0.03	9.81 x 10 ⁻⁰¹
hsa-let-7c	19004	3.81	± 1.88	3.44 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-21	5740	2.85	± 0.50	2.46 x 10 ⁻⁰⁵
hsa-miR-23a	11026	1.90	± 0.15	5.73 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-99a	11183	2.22	± 0.70	3.91 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-129*/129-3p	11200	4.48	± 1.57	4.08 x 10 ⁻⁰⁵
hsa-miR-141	10946	6.34	± 3.80	2.44 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-142-3p	10947	1.86	± 0.01	9.67 x 10 ⁻¹⁴
hsa-miR-142-5p	19015	1.32	± 0.06	1.27 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-192	13172	3.22	± 2.00	9.85 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-193b	10987	2.06	± 0.43	1.00 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-215	11015	9.87	± 7.98	9.89 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-221	11022	2.55	± 0.80	9.19 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-222	11023	1.60	± 0.40	1.96 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-376a	11089	1.92	± 0.40	3.58 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-429	13171	4.40	± 2.48	3.20 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-483-3p	13180	3.61	± 1.45	1.27 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-484	13181	1.84	± 0.11	3.91 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-516b	11151	3.16	± 1.23	4.58 x 10 ⁻⁰⁵
hsa-miR-518a-5p/527	11177	2.20	± 0.09	1.94 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-553	17271	1.97	± 0.47	1.57 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-606	17387	1.74	± 0.23	3.30 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-612	17346	1.36	± 0.13	3.78 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-626	17351	3.17	± 1.91	1.59 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-635	17391	4.16	± 1.62	2.10 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-649	15619	6.39	± 4.67	2.82 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-661	17582	4.19	± 1.14	6.51 x 10 ⁻⁰⁵
hsa-miR-18a	10983	0.43	± 0.20	1.48 x 10 ⁻⁰²
hsa-miR-18b	13141	0.33	± 0.07	4.92 x 10 ⁻⁰⁶
hsa-miR-19a	10997	0.31	± 0.05	4.43 x 10 ⁻⁰⁵
hsa-miR-19b	10998	0.40	± 0.13	3.14 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-29a	11039	0.47	± 0.10	6.80 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-106a/17	17605	0.50	± 0.10	9.22 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-152	17676	0.11	± 0.06	8.70 x 10 ⁻⁰⁶
hsa-miR-197	10992	0.11	± 0.11	5.19 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-494	14287	0.43	± 0.04	3.50 x 10 ⁻⁰⁴
hsa-miR-497	11129	0.05	± 0.05	5.49 x 10 ⁻⁰³
hsa-miR-592	17312	0.17	± 0.08	8.75 x 10 ⁻⁰⁴

6.1. Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Die in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir jeweils unentgeltlich geholfen. Ich habe keine Hilfe von Vermittlungs- oder Beratungsdiensten in Anspruch genommen.

Berlin, den 03.03.2017

Luisa Wiegboldt

6.2. Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

Berlin, den 03.03.2017

Luisa Wiegboldt

6.3. Lebenslauf

Zur Person

Name **Luisa Svenja Wiegboldt**
 Geburtsdatum 09.01.1984
 Geburtsort Berlin-Zehlendorf
 Wohnort Katharinenstr. 8, 10711 Berlin

Schulbildung

1990 - 1996 Nordgrundschule, Berlin
 1996 - 2000 Wilma-Rudolph-Oberschule, Berlin
 2000 - 2001 Hoosac Valley High School, Adams Massachusetts (USA)
 2001 - 2003 Wilma-Rudolph-Oberschule, Berlin
 17.06.2003 Abitur an der Wilma-Rudolph-Oberschule, Berlin

Studium

10/2003 - 11/2009 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
 14.09.2005 1.Staatsexamen
 10.11.2009 2.Staatsexamen
 10.12.2009 Approbation als Ärztin

Doktorarbeit

an der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV und dem Landeszentrum für Zell- und Gentherapie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Beruflicher Werdegang

02/2010 – 03/2016 Assistenzärztin, Gemeinschaftspraxis für Radiologie und Neuroradiologie & Zentrum für minimal invasive Therapie „Ihre-Radiologen“, Berlin
 29.2.2016 Anerkennung als Fachärztin für Radiologie
 06/2016 - heute Fachärztin für Radiologie, Gemeinschaftspraxis für Radiologie und Neuroradiologie & Zentrum für minimal invasive Therapie „Ihre-Radiologen“, Berlin

Sprachen

Deutsch und Englisch (fließend in Wort und Schrift)
 Französisch (Basiskenntnisse)

6.4. Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mir die Durchführung und Vollendung dieser Arbeit ermöglicht haben und mich auf unterschiedliche Arten unterstützt haben.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Schmoll (ehem. Direktor) sowie Herrn Prof. Dr. med. Müller-Tidow, Direktor der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danken, die mir die Möglichkeit gegeben haben, meine Dissertation an ihrer Klinik durchzuführen und mir insbesondere bei den formalen Aspekten über das üblich Maß hinaus geholfen haben.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Gerhard Behre, welcher mich während eines Praktikums in der Inneren Medizin dazu ermutigt hat eine wissenschaftliche Doktorarbeit zu beginnen und mich bis zum Ende unterstützt hat.

Des Weiteren möchte ich mich natürlich auch herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden für die unermüdliche Stärkung, Motivierung und das Korrekturlesen bedanken. Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Dr. rer. nat. Dennis Gerloff, der mir über die Jahre mit Rat und Tat beigestanden hat. Ohne seine methodische Unterstützung, seine unermüdliche Hilfestellung und konstruktive Kritik hätte ich es nicht geschafft diese Arbeit zu beenden.