



# **Einfluss der microRNA 215-5p auf die, durch RUNX1 vermittelte Expression der ABO-Blutgruppen-Antigene**

## **Bachelorarbeit**

**zur Erlangung des akademischen Grades**

**Bachelor of Science (B.Sc.)**

**Laura Schmidt**

Studiengang: Biotechnologie

Matrikelnummer: 4059999

1. Gutachter: Prof. Dr. habil. Hans-Jürgen Mägert

2. Gutachter: Dr. Romy Kronstein-Wiedemann

Datum der Abgabe: 12. Dezember 2017

Die Inhalte dieser Arbeit wurden erstmals unter dem Titel „Inhibition of the transcription factor Runx1 causes glycosyltransferase A repression“ am 25.10.2017 anlässlich der 50. Jahrestagung der „Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie“ in Köln publiziert.

## Abstract

The ABO blood group system is unequivocally the most important in clinical transfusion and transplantation medicine. Moreover, it is mixed up with the development of a high number of human diseases. The ABO antigens are non-confined to red blood cells but are widely expressed in a variety of human cells and tissues. In addition they suffer drastic changes during the development, differentiation and maturation of cells in the erythroid lineage. The molecular genetic basis of the ABO system has been known since 1990, but affront comprehensive investigations about the regulation of the ABO blood group receptor expression, the mechanism is not fully resolved. Also the mechanism, which leads to an altered ABO expression in hematological disorders remain unclear, as are the transient depression of A antigens observed in some pregnant women. Recently, it was identified that microRNAs (miRNAs) are significant in the regulation of blood group A antigen expression levels. MiRNAs are short, endogenous, single-stranded RNA molecules which regulate the posttranscriptional gene expression by translational repression or by destabilizing target transcripts. Numerous miRNAs, which were up- or downregulated in red blood cells of blood group O and of heterozygous genotypes as compared to homozygous genotype, possess potential binding sites in the 3'UTR of several transcription factors, such as RUNX1. It has been further embarking on the underlying mechanisms of miRNA and glycosyltransferase interactions and has been shown that silencing of the transcription factor RUNX1 led to downregulation of blood group A antigen. Knockdown experiments for RUNX1 by lentiviral gene transfer of shRNA and by miR-215-5p in primary hematopoietic stem cells were performed, and analyzed the blood group A antigen expression using different methods, including morphology, flow cytometry, CFU-Assay and qPCR. All in all, the knockdown of RUNX1 by shRNA led to decrease the levels of blood group A antigen in red blood cells and also reduced the number of blood group A positive erythroid cells. Besides, the inhibition of RUNX1 by miR-215 led to downregulation of blood group A antigen expression and reduction of blood group A positive erythroid cells, as well, and decreased the levels of RUNX1 and glycosyltransferase A mRNA. By means of the knowledge about the role of miR-215 and other miRNAs as well as transcription factors such like RUNX1 in the expression of the ABO blood group antigens, it is possible to strike a new pathway for therapeutic interventions in diseases where blood receptors promote pathological diseases.

## Danksagung

Mein größtes Dankeschön gilt Herrn Prof. Dr. med. Torsten Tonn, der mir die Möglichkeit geboten hat an diesem spannenden und sehr interessanten Projekt in seiner Arbeitsgruppe zu arbeiten.

Bei Frau Dr. Romy Kronstein-Wiedemann möchte ich mich ebenfalls ganz herzlich für die Betreuung in der letzten neun Monate bedanken. Vielen Dank für Deine unermüdliche Unterstützung und die hervorragende Betreuung während meiner Arbeit im Institut für experimentelle Transfusionsmedizin.

Ein großes Dankeschön gilt auch Herrn Dr. Jörn Lausen und Herrn Dr. Peter Milanov vom Institut für Transfusionsmedizin, DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen, Frankfurt am Main. Vielen Dank für die Bereitstellung der lentiviralen shRNA-Plasmide, sowie des Hüllproteins und des Capsids.

Ebenfalls möchte ich mich bei Julia Jarrels und Brita Schilling bedanken, die die microArray-Analysen durchgeführt haben.

# Inhaltsverzeichnis

Abstract .....	III
Danksagung .....	IV
I. Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
II. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	XI
III. Formel- und Gleichungsverzeichnis.....	XIII
1. Einleitung.....	1
1.1 Erythropoese .....	1
1.2 Das ABO-System .....	3
1.3 Der Transkriptionsfaktor RUNX1 .....	4
1.4 microRNA und anti-microRNAs .....	5
1.5 Bedeutung der Blutgruppen-Regulation bei hämatologischen Krankheiten .....	6
2. Fragestellung .....	7
3. Materialien und Methoden .....	8
3.1 Materialien .....	8
3.1.1 Reagenzien und Kits .....	8
3.1.2 Zellen .....	9
3.1.3 Plasmide und virale Konstrukte.....	10
3.1.4 Pre-microRNA und reife microRNA .....	10
3.1.5 Primer und TaqMan microRNA-Assays .....	11
3.1.6 Zytokine .....	11
3.1.7 Medien und Puffer .....	12
3.1.8 Antikörper .....	14
3.1.9 Geräte.....	14
3.1.10 Verbrauchsmaterialien.....	15
3.2 Methoden.....	17
3.2.1 Zellkultur-Methoden .....	17
3.2.1.1 Isolation .....	17

3.2.1.1.1	Anreicherung von mononukleäre Zellen des peripheren Blutes mittels Dichtegradientenzentrifugation .....	17
3.2.1.1.2	Isolation von CD34-postiven Stammzellen.....	17
3.2.1.2	Kultivierung .....	18
3.2.1.2.1	Kultivierung der Zell-Linie 293T.....	18
3.2.1.2.2	Kultivierung von K562-Zellen.....	19
3.2.1.2.3	Kultivierung humaner CD34 <sup>+</sup> -hämatopoetischer Stammzellen .....	19
3.2.2	molekularbiologische Methoden .....	20
3.2.2.1	Plasmid-Präparation .....	20
3.2.2.2	Virusproduktion.....	21
3.2.2.3	Bestimmung des lentiviralen Titers mit K562-Zellen .....	22
3.2.2.4	Transduktion.....	22
3.2.3	Analysemethoden .....	24
3.2.3.1	Durchflusszytometrische Analyse .....	24
3.2.3.2	CFU-Assay .....	24
3.2.3.3	Zytospin .....	25
3.2.3.4	RNA-Isolation.....	26
3.2.3.5	Reverse Transkription.....	27
3.2.3.6	Real-time PCR.....	27
4.	Ergebnisse.....	29
4.1	Der Einfluss der miRNA-215-5p auf die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen.....	30
4.2	Der Einfluss der miR-215-5p auf die Expression der Blutgruppe A.....	37
5.	Diskussion.....	47
6.	Ausblick.....	53
7.	Zusammenfassung.....	54
	Literaturverzeichnis & Quellenverzeichnis.....	55
	Anhang .....	A

Anhangverzeichnis.....	A1
Eidesstattliche Erklärung.....	B

## I. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AB-Serum	Human Male AB Plasma Serum
AML	akute myeloide Leukämie
Anti-miRNA	anti-microRNA
APC	Allophycocyanin
BFU-E	Burst forming unit-erythroid
BG	Blutgruppe
bp	Basenpaare
BSA	Basal Serum Albumine
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
ca.	Zirka
CBF-β	DNA-Bindungs-unabhängigen heterodimeren Kernbindungsfaktor
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary Desoxyribonucleinacid
CFU-Assay	Colony-forming Unit-Assays
CFU-E	Colony forming unit-erythroid
CFU-GEMM	Colony forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte
CFU-GM	Colony forming unit-granulocyte, macrophage
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CRK	Chromatin Remodeling Komplex
d.h.	das heißt
DGZ	Dichtegradientenzentrifugation
DHS	DNase-1-hypersensitive Stellen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphate

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
g	Gramm
G-CFS	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
HC	Hydrocortisone
HCl	Chlorwasserstoff
hGAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HSA	Humanes Serum Albumin
IgM	Agglutinine
IL-3	Interleukin-3
kb	Kilobasen
l	Liter
LB-Medium	Luria-Broth-Medium
MACS	Magnetic Cell Separation
MEM	Minimum Essential Serum
Mg	Magnesium
min	Minute
miRNA	micro Ribonucleinacid (auch miR)
ml	Milliliter
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger Ribonucleinacid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NEAA	Non-Essential Amino Acid
ng	Nanogramm
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
P/S	Penicillin/ Streptomycin
P1	Promotor 1
P2	Promotor 2
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyetherimid
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
Pre-miRNA	Stemloop-precursor-miRNA
Pri-miRNA	primäre miRNA
qPCR	real-time quantitative polymerase chain reaction
RISC-Komplex	RNA-induzierter Silencing-Komplex
RNA	Ribonucleinacid
RNase II	Ribonuclease II
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute-Medium
RT	Raumtemperatur
RUNX	Runt-related transcription factor
SCF	Stem Cell Factor
SEM	Standard Error Mean
SFEM	Serum-Free Expansion Medium
shRNA	Short hairpin Ribonucleinacid
SP1	specificity protein 1
Tab.	Tabelle
TB	Terrific Broth
TE	Trizma® HCl und Ethylendiamintetraessigsäure
TF	Transkriptionsfaktor
TPO	Thyreoperoxidase
Trizma® HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan + Hydrochlorid
TU	Technische Universität
U	Enzymeinheit
UTR	nicht-translatierter Bereich
x g	Erdbeschleunigung
YY1	Yin-Yang 1
z.B.	zum Beispiel

## II. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Darstellung der Zellexpansion im Verlauf der Erythropoese .....	30
<b>Abbildung 2:</b> Graphische Darstellung der Anzahl der verschiedenen Kolonie-Arten .....	32
<b>Abbildung 3:</b> Prozentualer Anteil der jeweiligen Kolonie-Art an der Gesamtkoloniezahl.....	33
<b>Abbildung 4:</b> Prozentualer Anteil von CFU-Es und BFU-Es an der erythroiden Gesamtkolonieanzahl	34
<b>Abbildung 5:</b> Mikroskopische Analyse der Zelldifferenzierung im Verlauf der Erythropoese.....	35
<b>Abbildung 6:</b> Darstellung der relativen Expressionen.....	37
<b>Abbildung 7:</b> Gating-Strategie der durchflusszytometrischen Analyse .....	39
<b>Abbildung 8:</b> Durchflusszytometrische Analyse von CD235a-positiven Zellen im Verlauf der Erythropoese, N = 3 .....	40
<b>Abbildung 9:</b> Blutgruppe A-positive erythroide Zellen .....	43
<b>Abbildung 10:</b> Darstellung der Expression des BG A-Antigens pro erythroider Zelle.....	44
<b>Abbildung 11:</b> Zusammenfassende Übersicht der Daten aus den Experimenten mit shRNAs .....	A2
<b>Abbildung 12:</b> Darstellung der MicroArray-Ergebnisse .....	A3
<b>Abbildung 13:</b> Darstellung des pLV-miR-Locker-Vektors .....	A4
<b>Abbildung 14:</b> Darstellung des pLV-miRNA Vektors .....	A4
<b>Abbildung 15:</b> Durchflusszytometrischen Analyse der mCherry- und GFP-positiven Zellen im Verlauf der Erythropoese.....	A11

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Reagenzien und Kits.....	8
<b>Tabelle 2:</b> Plasmide und virale Konstrukte.....	10
<b>Tabelle 3:</b> Pre-microRNA und reife microRNA .....	10
<b>Tabelle 4:</b> Primer und TaqMan microRNA Assays .....	11
<b>Tabelle 5:</b> Zytokine .....	11
<b>Tabelle 6:</b> Lösungen .....	12
<b>Tabelle 7:</b> Antikörper .....	14
<b>Tabelle 8:</b> Geräte.....	14
<b>Tabelle 9:</b> Verbrauchsmaterialien.....	15
<b>Tabelle 10:</b> Mittelwerte und Standardabweichung der Zellexpansionen bezogen auf eine hämatopoetische Stammzelle, N = 3 unabhängige Spender .....	30
<b>Tabelle 11:</b> Ermittelte Zellsuspensions-Volumina, Zellzahlen pro Milliliter, sowie die Gesamtzellzahl der transduzierten Proben an verschiedenen Tagen der Kultivierung. N = 3 Experimente .....	A5
<b>Tabelle 12:</b> Übersicht über die Gesamtkolonieanzahl, sowie die Anzahl der einzelnen Kolonie-Arten der miR-215-Probe .....	A6
<b>Tabelle 13:</b> Übersicht über die Gesamtkolonieanzahl, sowie die Anzahl der einzelnen Kolonie-Arten der mock-Probe.....	A6
<b>Tabelle 14:</b> Übersicht über die Gesamtkolonieanzahl, sowie die Anzahl der einzelnen Kolonie-Arten der locker-miR-215-5p-Probe.....	A7
<b>Tabelle 15:</b> Übersicht über die Gesamtkolonieanzahl, sowie die Anzahl der einzelnen Kolonie-Arten der Locker-mock-Probe.....	A7
<b>Tabelle 16:</b> Mittelwerte und Standardabweichung der jeweiligen Kolonie-Art bezogen auf die Gesamtkoloniezahl .....	A8
<b>Tabelle 17:</b> Prozentualer Anteil an CD235a-positiven Zellen der transduzierten Proben.....	A9
<b>Tabelle 18:</b> Prozentualer Anteil an BG A-positiven Blutzellen der transduzierten Proben bezogen auf die gesamte erythroide Population.....	A9
<b>Tabelle 19:</b> Prozentualer Anteile der errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen an CD235a-, BG A-positiven Zellen und dem Anteil an BG A-Antigen pro erythroider Zelle.....	A10
<b>Tabelle 20:</b> Auflistung der mittels reverse Transkription erhalten RNA-Konzentrationen.....	A12
<b>Tabelle 21:</b> Auswertung des 1. Versuches der Real-time PCR-Analyse mittels $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode .....	A13
<b>Tabelle 22:</b> Auswertung des 2. Versuches der Real-time PCR- Analyse mittels $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode .....	A14
<b>Tabelle 23:</b> Auswertung des 3. Versuches der Real-time PCR- Analyse mittels $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode .....	A15
<b>Tabelle 24:</b> Mittelwerte und Standardabweichung der mittels $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ermittelten .....	A15

### III. Formel- und Gleichungsverzeichnis

<b>Gleichung 1:</b> Berechnung des lentiviralen Titers .....	22
<b>Gleichung 2:</b> Zellzahlberechnung .....	23
<b>Gleichung 3:</b> Eingesetztes Zellvolumen für den CFU-Assay .....	25
<b>Gleichung 4:</b> Berechnung des $\Delta\text{Ct}$ -Wertes .....	28
<b>Gleichung 5:</b> Berechnung des $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wertes .....	28
<b>Gleichung 6:</b> Berechnung des Expressionsunterschiedes .....	28

## 1. Einleitung

Das ABO-Blutgruppensystem hat sich seit der Entdeckung durch Karl Landsteiner zu einem entscheidenden Faktor in der klinischen Behandlung von Patienten entwickelt. Da die ABO-Antigene nicht nur in roten Blutzellen, sondern auch von humanen Zellen und Geweben exprimiert werden, ist das Wissen über das ABO-System bei Bluttransfusionen oder Organtransplantationen unerlässlich. Allerdings wird ihm auch bei der Entstehung von zahlreichen humanen Erkrankungen eine bedeutende Rolle zugeschrieben. Darunter zählen vor allem eine Vielzahl von Krebserkrankungen, die mit einer veränderten Antigen-Expression einhergehen. Da die Krankheit Krebs ein allgegenwärtiges Thema in der Gesellschaft ist, könnte die Aufklärung der zugrundeliegenden regulatorischen Mechanismen ein wichtiger Schritt für therapeutische Interventionen darstellen.

Diese praktische Bachelorarbeit konzentriert sich auf den Einfluss einer microRNA, die in verschiedenen Krebsarten als Onkogen wirkt, auf die Expression der ABO-Blutgruppen-Antigene. Die Experimente wurden an der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der TU Dresden durchgeführt. Dabei konzentrierten sich Arbeiten der Sicherheitsstufe 1 auf das Institut für experimentelle Transfusionsmedizin, Sicherheitsstufe 2-Arbeiten wurden am Medizinisch-Theoretisches Zentrum des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus im Institut für Kardiologie durchgeführt.

### 1.1 Erythropoese

Im Gefäßsystem des Menschen zirkulieren durchschnittlich vier bis sechs Liter (l) Blut, um sowohl Sauerstoff und Nährstoffe zu transportieren, als auch bei der Regulation der Körpertemperatur zu helfen. Dabei beläuft sich der nicht-zelluläre Anteil, das Blutplasma, auf 55 Prozent (%) des Gesamtblutvolumens, der zelluläre Anteil beträgt 45 %. Neben Leukozyten und Thrombozyten befinden sich unter den zellulären Bestandteilen des Blutes auch Erythrozyten. Der menschliche Körper enthält pro Mikroliter ( $\mu$ l) Blut zirka fünf Millionen rote Blutkörperchen und ist außerdem täglich dazu in der Lage mehr als 250 Milliarden neue zu bilden. Der neu gebildete Anteil an Erythrozyten beläuft sich allerdings nur auf ca. 1 % des im Körper befindlichen Gesamtanteils (Schiebler, 1991; Kügler, 2012). Dieser Vorgang, der Erneuerung und Bildung von Erythrozyten, wird Erythropoese genannt und umfasst insgesamt sieben Entwicklungsstufen. Die Erythropoese resultiert aus der Hämatopoese, in der sich aus hämatopoetischen Stammzellen verschiedene Vorläuferzellen der Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten (CFU-GEMM) entwickeln. Ab dieser Stufe der Hämatopoese hat die Zelle die Möglichkeit entweder mit der Erythropoese oder Thrombozytopoese fortzufahren oder sich für die Differenzierung zu Granulozyten bzw. Makrophagen (CFU-GM) zu entscheiden. Fährt

die Vorläuferzelle mit der Erythropoese fort, so entwickelt sie sich über die frühe Vorläuferzelle von Erythrozyten, den Proerythroblasten (BFU-E), zu basophilen und polychromatischen Erythroblasten. Durch Zellteilung entstehen anschließend aus der erythropoetischen Vorläuferzelle, dem Pronormoblast (CFU-E), Normoblasten, die aufgrund von heranwachsenden Ribosomen das Protein Hämoglobin bilden können. Im Anschluss an die letzte kernhaltige Reifungsphase, bei der azidophile Normoblasten ihren Zellkern auswerfen, entwickeln sich Retikulozyten. Diese verweilen 1 – 2 Tage im Knochenmark, bevor sie anschließend in die Blutbahn gelangen und in der Milz oder Leber zu Erythrozyten heranreifen (Hoffbrand, 2003; Aumüller, 2007). Der wichtigste Wachstumsfaktor während der Umwandlung von erythroiden Vorläuferzellen zu Erythrozyten stellt das Erythropoetin (EPO) dar. Erythropoetin ist ein Glycoprotein, welches aus 165 Aminosäuren besteht und bei Sauerstoffmangel zu 90 % im Nieren- bzw. zu 10 % im Lebergewebe synthetisiert wird. Es fördert neben dem Sauerstofftransport auch die Proliferation und Ausdifferenzierung von roten Blutzellen (Fandrey, 2015; Schmidt, 2017; Benz, 2005). Während ihrer Reifung haben Erythrozyten ihre Fähigkeit zur Desoxyribonucleinsäure (DNA)-, Ribonucleinsäure (RNA)-, Häm-, Lipid- und Proteinsynthese verloren, müssen jedoch weiterhin ihrer Aufgabe als Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) – und Sauerstoff (O<sub>2</sub>) – Lieferant nachkommen (Benz, 2005). Da sie keine Mitochondrien besitzen, die als Energiequelle fungieren, nutzen sie den nicht-oxidativen Zweig des Pentosephosphatwegs, um das benötigte Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) zu generieren. Dazu wird die aus der anaeroben Glykolyse enthaltene Glucose zu NADPH verstoffwechselt. Des Weiteren sind sie aufgrund der hohen Hämoglobinkonzentration und des ebenfalls erhöhten Eisengehalts in den Zellen permanenten oxidativen Stress ausgesetzt. Aufgrund dessen sind sie auf Antioxidantien, wie zum Beispiel Glutathion, angewiesen. Glutathion, ein Tripeptid aus Glutamat, Cystein und Glycin, reduziert nicht nur Enzymunabhängig das Eisen des Methämoglobins, sondern schützt auch die Erythrozytenmembran gegen schädliche Oxidationsprozesse. Dazu überträgt es den Wasserstoff seiner freien Thiolgruppe auf Radikale, um diese unschädlich zu machen, bevor wichtige Enzyme angegriffen und zerstört werden. Ohne die Anwesenheit von Antioxidantien würde es zur vorzeitigen Apoptose der roten Blutzellen kommen (medi-learn.de, 2017; Benz, 2005; Remmele, 2013).

## 1.2 Das ABO-System

Das Blut ist nicht nur für den Sauerstoff- und Wärmetransport im Körper von enormer Bedeutung, sondern auch für die Hämostase, Homöostase und zahlreiche Abwehrmechanismen des Immunsystems (Benz, 2005). Umso wichtiger war die Entdeckung der Blutgruppen durch Karl Landsteiner im Jahr 1900 (Landsteiner, 1900) und die Aufklärung ihrer molekularen Struktur (Clausen, 1990) für die Transfusions- und Transplantationsmedizin. Die Einteilung der Blutgruppen (BG) in Landsteiners ABO-Blutgruppensystem basiert auf den Eigenschaften der auf der Glykokalix der Erythrozyten befindlichen Antigene. Derzeit sind 346 verschiedene BG-Antigene bekannt, von denen 308 zu den insgesamt 36 verschiedenen Blutgruppensystemen gehören (Storry, 2016). Die aus dem ABO-System hervorgehenden vier Hauptgruppen kennzeichnen sich durch das Vorhandensein von drei Antigenen, die sich aus verschiedenen Oligosacchariden zusammensetzen. Die Blutgruppe O kennzeichnet sich durch das H-Antigen (auch H-Substanz), welches aus fünf Monosacchariden besteht (Glucose, Galactose, N-Acetyl-Glucosamin, Galactose und Fucose) und als Grundsubstanz für die Antigene A und B dient. Letztere werden durch zwei zusätzliche Glykosyltransferasen charakterisiert, die eine Modifikation der H-Substanz vornehmen. Träger des A-Antigens besitzen somit zusätzlich die Allele für die N-Acetyl-Galactosamin-Glykosyltransferase, welche sich an die Galactose der H-Substanz knüpft. Dahingegen besitzen diejenigen mit B-Antigen die Allele für eine zusätzliche Galactose (Rassow, 2008; Murken, 2017). Neben den vier Hauptgruppen (A, B, AB und O) des Blutgruppensystems nach Landsteiner gibt es auch zahlreiche Untergruppen mit schwacher Blutgruppen-Expression. Dazu zählen neben den bekannten Untergruppen der Blutgruppe A ( $A_1$  und  $A_2$ ), auch wesentlich seltenere Untergruppen, wie zum Beispiel (z.B.)  $A_{int}$ ,  $A_3$ ,  $A_x$ ,  $A_m$ ,  $A_{end}$ ,  $A_{bant}$  und  $A_{el}$ . Auslöser für ihre schwache Blutgruppen-Expressionen sind oftmals Polymorphismen innerhalb oder Mutationen außerhalb des Glykosyltransferase-Enzyms (Hosseini-Maaf, 2003). Es wurden jedoch auch regulatorische Elemente in der DNA-Sequenz der Glykosyltransferase gefunden, die ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Expression spielen. Darunter befinden sich ein zelltyp-spezifischer Promotor am 5'Ende der CpG-reichen Region, der sich 3,8 Kilobasen (kb) außerhalb des Exon 1 befindet und weitere negativ regulatorische Elemente in der 3'Region der DNA-Sequenz der Glykosyltransferase ca. 2,2 kb unterhalb des ABO-Gens (Schmidt, 2017). Außerdem übt ein ubiquitärer proximaler Promotor in der Cytosinphosphatidyl-Guanin (CpG)-reichen Region oberhalb des Startcodons, welcher eine Transkriptionsfaktorbindungsstelle für das Protein SP1 aufweist, eben einen Einfluss auf die Genexpression aus. Mutationen oder Methylierungen des Promotors, wodurch das Protein SP1 nicht mehr binden kann, beeinflussen nicht nur die ABO-Genexpression, sondern können auch einen Aktivitätsverlust des Promotors von 30 % herbeiführen (Hata, 2001; Schmidt, 2017). Neben einer Vielzahl an Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (TF), die an der Regulation der Glykosyltransferase beteiligt sind und sich innerhalb der CpG-Islands des proximalen Promotors befinden, wurde im Jahr 2014

über die Rolle einer, außerhalb des proximalen Promotor liegenden TF-Bindungsstelle berichtet (Takahashi, 2014; Sano, 2015). Diese Region, welche Bindungsstellen für die TFs GATA1 und GATA2, sowie des RUNT-verwandten Transkriptionsfaktors 1 (RUNX1) bereitstellt, befindet sich im Intron 1 des humanen ABO-Gens und weist bei Individuen mit einem  $A_m$ -,  $B_m$ - und  $AB_m$ -Phänotypen eine Deletion auf. Diese Deletion verursacht bei Personen der Blutgruppe  $A_m$  eine Löschung der RUNX1-Bindungsstelle, bei Individuen der BG  $B_m$  und  $AB_m$  erfolgt sogar eine Deletion der GATA- und RUNX1-Bindungsstellen. Dadurch wurde vermutet, dass es aufgrund dieser Mutationen zu einer Herabregulation der Transkription der A- und B-Allele und somit auch zu einer Verringerung der spezifischen Antigen-Expression kommt (Sano, 2015; Schmidt, 2017; Takahashi, 2014).

### 1.3 Der Transkriptionsfaktor RUNX1

Im Rahmen des Transkriptions-Starts binden DNA-abhängige RNA-Polymerasen regulatorische Elemente, wie zum Beispiel an Promotoren, um Informationen über den Transkriptionsstart und den zu transkribierenden DNA-Strang zu erhalten. Das Aufspüren und Binden an die Promotoren können Polymerasen jedoch nicht selbst initiieren, sondern benötigen dazu die Unterstützung von Transkriptionsfaktoren (Mehrke, 2017). TFs sind trans-regulatorische Proteine, die sich durch die Wechselwirkung mit cis-regulatorischen DNA-Elementen (Promotoren, Enhancer und Silencer) kennzeichnen und die Transkription durch Hemmung oder Aktivierung regulieren können (Schmidt, 2017). Dabei lagern sie sich an die RNA-Polymerase an und helfen ihr, die richtige Bindungsstelle an regulatorischen Elementen zu finden und die Wasserstoffbrücken-Bindungen des DNA-Strangs aufzulösen (Rassow, 2008). Ein wichtiger hämatopoetischer Transkriptionsfaktor, welcher in den 1990er Jahren von H. Miyoshi identifiziert wurde, ist RUNX (Miyoshi, 1991). Dieser kommt in Säugern in drei verschiedenen Formen vor, die sich durch ihre DNA-bindenden  $\alpha$ -Untereinheiten in RUNX1, RUNX2 und RUNX3 unterscheiden (Schmidt, 2017). Bei RUNX1 handelt es sich um eine Form des RUNX', die in hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird und am häufigsten in humaner akuter Leukämie auftritt. RUNX2 hingegen ist bei der Knochenbildung und RUNX3 bei der neuronalen, sowie T- und dendritischen Zellentwicklung von entscheidender Bedeutung. Der TF RUNX1 ist auf dem Chromosom 21 im Abschnitt q22 lokalisiert und umfasst 11 Exons und zwei Promotoren (P1 und P2) (Ito, 2004). Des Weiteren weist RUNX1 drei Isoformen, RUNX1a, RUNX1b, RUNX1c, auf, die sowohl durch die zwei Promotoren, als auch durch Spleißen transkribiert werden (Schmidt, 2017). Während der Promotor 1 (P1) für die Transkription der längsten, aus 483 Aminosäuren (AS) bestehenden Isoform RUNX1c, verantwortlich ist, transkribiert P2 die Isoformen RUNX1a (250 AS groß) und RUNX1b (453 AS groß). RUNX1 besitzt neben einer DNA-bindenden RUNT-Domäne auch eine Transaktivierungs-, drei Inhibierungs-,

sowie eine Prolin-/Serin-/Threonin-reiche Domäne. Da das Protein selbst nur schwach an die DNA binden kann, erfolgt die Bindung eines DNA-Bindungs-unabhängigen heterodimeren Kernbindungs-faktor (CBF- $\beta$ ), welcher die Bindungsaffinität verstärkt (Elagib, 2003). Darüber hinaus vermittelt die RUNT-Domäne die Dimerisierung von RUNX1 mit CBF- $\beta$ , welche zum Schutz vor einer rapiden Proteolyse und zur Stabilisierung der DNA-Bindung dient (Elagib, 2003; Rowley, 2015). RUNX1, welches ursprünglich als Fusionsprotein aus Patientenproben mit akuter myeloischer Leukämie (AML) und zusätzlicher chromosomaler t(8;21)(q22;q22)-Translokation isoliert wurde, ist außerdem eines der am häufigsten von Mutationen betroffenen Gene bei akuter Leukämie und an über 30 weiteren Chromosomentranslokationen beteiligt (Blyth, 2005).

#### **1.4 microRNA und anti-microRNAs**

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, endogene Einzelstrang RNA-Moleküle, welche die posttranskriptionale Genexpression entweder durch Hemmung der Translation oder durch Destabilisierung des Target-Transkripts regulieren (Bruchova, 2007). Die reifen miRNAs, welche 20 - 24 bp lang sind, werden aus ihren Vorläufern, den Stemloop-precursor-miRNAs (auch pre-miRNAs), gebildet. Diese kennzeichnen sich durch eine Länge von 60 - 80 Basen und einem 3'Überhang aus 2 Nukleotiden. Pre-miRNAs leiten sich wiederum von primären miRNA-Transkripten (pri-miRNAs) ab, die das Produkt aus der RNA-Polymerase-II-Aktivität und unabhängiger Transkriptionseinheiten sind (Lee, 2004). Pri-miRNAs werden zunächst im Zellkern durch einen Mikroprozessor-Komplex, bestehend aus Nukleasen, assoziierten Faktoren, RNase III Drosha und ihrem Cofaktor DGCR8/Pasha, zu einem pre-miRNA-Stemloop katalysiert und anschließend aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert (Yi, et al., 2003). Im Zytoplasma wird die pre-miRNA anschließend zu einer Länge von 20 - 24 Nukleotiden mit Hilfe eines Dicers gespalten und in den sogenannten RNA-induzierten Silencing (RISC)-Komplex aufgenommen. Im RISC-Komplex kann die reife miRNA nun die gewünschte mRNA herunterregulieren. Die Proteinproduktion kann darauf folgend entweder durch eine Translationsinhibierung oder durch die Zersetzung des Transkripts gehemmt werden (Shivdasani, 2006).

Anti-microRNAs (anti-miRNAs) sind künstlich hergestellte Oligonucleotide, die gezielt an reife microRNAs im Zytoplasma binden und die Funktion der endogenen miRNA inhibieren (Sun, 2017). Die Grundlage für eine erfolgreiche Inhibierung stellt die komplementäre Struktur der anti-miRNA zur miRNA-Struktur dar und das Vorherrschen einer deutlich höheren Bindungsaffinität zur anti-miRNA, als zur endogenen miRNA (Stenvang, 2012). Aufgrund der Anlagerung der anti-miRNA an die reife miRNA kann die Bindung an den 3'Strang des untranslatierten Bereichs (UTR) der Target-mRNA und die Regulation der Target-mRNA-Expression nicht mehr erfolgen (Sun, 2017; Stenvang, 2012).

## 1.5 Bedeutung der Blutgruppen-Regulation bei hämatologischen Krankheiten

Das ABO-System stellt das wichtigste Blutgruppensystem in der klinischen Transfusions- und Transplantationsmedizin dar. In Abhängigkeit von der ABO-Blutgruppe jedes einzelnen Individuum können die im Serum enthaltenen, vorab gebildeten Oberflächenantigen-Antikörper, Agglutinine (IgM), eine Hauptbarriere bei ABO-inkompatiblen Bluttransfusionen oder Organtransplantationen darstellen (Olsson, 2001). Insbesondere die Sera von Individuen mit seltenen Blutgruppen, wie z.B. der BG „Bombay“, stellen eine Herausforderung für Transfusionsmediziner dar. Ihr Serum enthält nicht nur die so genannten Landsteiner-Antikörper (Anti-A- und Anti-B-Antikörper), sondern auch IgM-Anti-H (Rump, 2003). Diese Agglutinine richten sich gegen alle Erythrozyten der BG A, B, AB und O und verursachen bei einer Reaktion eine akute Verklumpung der roten Blutzellen. Daraus resultiert, dass Patienten mit der Blutgruppe Bombay nur mit Eigenblut oder Spenderblut von Menschen derselben Blutgruppe „Oh“ transfundiert werden können (Scholz, 2010). Neben seltenen Blutgruppen, bei denen die Blutversorgung meist nur anhand von Kryo-konservierten Erythrozytenkonzentraten vorgenommen werden kann, stellt eine transiente Abnahme des A-Antigens bei schwangeren Frauen eine weitere Barriere in der Transfusionsmedizin dar (Thuresson, 2008). Dazu wurde im Jahr 2001 in Schweden eine Studie zur Untersuchung von abweichenden ABO-Expressionen durchgeführt, deren Hauptaugenmerk unter anderem die geschwächte A-Antigen-Expression war. Schwangere Frauen mit einer verringerten A-Aktivität zeigten zusätzlich eine zehn prozentige Abnahme der Antikörperbildung in roten Blutzellen. Allerdings konnten diese Beobachtungen nicht auf ein abnormales A-Allel zurückgeführt werden, da einige der Frauen nach ihrer Schwangerschaft wieder eine normale A-Antigen-Expression zeigten (Olsson, 2001). Des Weiteren konnte veränderte ABO-Expression des A-Antigens in hämatologischen Erkrankungen erstmals vor 60 Jahren beschrieben und bestätigt werden (van Loghem Jr., 1957). Nicht nur in der Schwangerschaft, sondern auch bei Patienten mit verschiedenen hämatologischen Erkrankungen, unter anderem mit akuter oder chronischer myeloider Leukämie, multiplem Myelom und Non-Hodgkin-Lymphom, konnte eine variable und veränderte A- und B-Antigenexpression festgestellt werden (Olsson, 2001). Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte keine genaue Ursache für ein verändertes Expressionsverhalten in hämatologischen Malignitäten gefunden werden. Zwar konnte schon mehrfach gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor RUNX1 und die miRNA-215 bei hämatologischen Erkrankungen beteiligt sind (Sood, 2017; Vasilatou, 2009), allerdings konnte noch keine Verbindung zu einer veränderten ABO-Expression hergestellt werden.

## 2. Fragestellung

Innerhalb der DNA-Sequenz der Glycosyltransferase wurden viele regulatorische Elemente gefunden, darunter viele Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation dieses Glycoproteins beteiligt sind, beispielweise durch ihre Bindung an die Promotorregion des ABO-Gens. Eine japanische Forschergruppe berichtete im Jahr 2014 über die Rolle einer, außerhalb des proximalen Promotors liegenden Transkriptionsfaktor (TF)-Bindungsstelle für den TF RUNX1. Diese befindet sich im Intron 1 und weist bei Personen mit der BG  $A_m$  bzw.  $B_m$  eine Deletion auf. Dadurch kam es zu der Vermutung, dass diese Mutationen zu einer Herabregulation der Transkription der A- und B-Allele, sowie zu einer Verringerung der spezifischen Antigen-Expression führen (Sano, et al., 2014; Takahashi, 2014). Daher wurde die Rolle von RUNX1 zuerst mit Hilfe von shRNAs näher untersucht. Dabei konnte herausgefunden werden, dass die Hemmung von RUNX1 durch shRNAs zu einer Verringerung der BG A-positiven Zellen und zu einer verringerten Anzahl an BG A-Antigenen pro Zelle führte. Aufgrund der positiven Ergebnisse dieser Experimente wurde auf die microArray-Analyse, welche innerhalb vergangener Forschungsprojekte der Arbeitsgruppe durchgeführt wurde, zurückgegriffen. Diese zeigte microRNAs, die in Erythrozyten der Blutgruppe OO, OA und Ax im Vergleich zum homozygoten Genotyp hochreguliert waren. Da einige dieser miRNAs Bindungssequenzen in der 3'UTR verschiedener Transkriptionsfaktoren aufweisen, wurde der Fokus nun auf miRNAs gelegt, die solche potenziellen Bindungsstellen in der 3'UTR von RUNX1 besitzen. Dabei konnte die miRNA 215-5p identifiziert werden, die mehr als doppelt so stark in Zellen der BG O gegenüber AA exprimiert wird. Aufgrund dessen wurden nun Experimente mit dieser microRNA durchgeführt, um eine mögliche Beteiligung an der Regulation der ABO-Blutgruppenantigene feststellen zu können. Dazu wurde sowohl der miR-215-Stemloop, der die miR-215-5p enthält, überexprimiert, als auch ein zweites sogenanntes Locker-miR-Plasmid, zur spezifischen Hemmung der endogenen miR-215-5p, eingesetzt. Dabei wurde sich in der vorliegenden Bachelorarbeit speziell auf den Einfluss der miR-215-5p auf die durch RUNX1 vermittelte Expression der ABO-Blutgruppen-Antigene fokussiert.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Reagenzien und Kits

Tabelle 1: Reagenzien und Kits

Bezeichnung	Firma/Firmensitz
Ampicillin (sodium salt 5 g)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt
Bacto-Agar	BD Biosciences, Heidelberg
Biocoll	Biochrom, Berlin
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt
CellWASH	BD Biosciences, Heidelberg
DMEM Media-GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
DMSO	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt
EDTA	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Ethanol absolute EMPLURA®	Merck, Darmstadt
Ethanol denaturiert 99 %	VWR Chemicals, Dresden
FBS	Biochrom, Berlin
Giemsa Stain, Modified Solution	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt
Glycerol	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt
Heparin	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt
Holo-Transferrin	R&D Systems, Wiesbaden
Humanes Serum Albumin (HSA)	Baxalta, Unterschleißheim
Human Male AB Plasma Serum (AB-Serum)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt
Hydrocortisone	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt
Insulin solution (recombinant human)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt
Iscove's Basal Medium w/o L-Glutamine	Biochrom, Berlin
Iscove's Modified Dulbecco-Medium + 2 % FBS	StemCell Technologies, Köln
L-Glutamine	Biochrom, Berlin
Luria-Bertani Broth Pulver	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt
May-Grünwald Solution	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt
MethoCult™ H8443	StemCell Technologies, Köln
Natriumazid	BD Biosciences, Heidelberg
PBS (1 x) mit Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt
PBS (10 x) ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom, Berlin

Penicillin/Streptomycin (P/S)	Biochrom, Berlin
Polybrene (Hexadimethrine bromide)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt
Qiagen Plasmid Maxi Kit (25)	Qiagen, Hilden
StemSpan SFEM	StemCell Technologies, Köln
Steriles Wasser	Seral Reinstwasser-Systeme
Steriles Wasser für Molekularbiologie	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt
Terrific Broth Pulver	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt
Trizma® HCl	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt
Trypanblau 0,4 %	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Trypsin-EDTA	Lonza, Basel
PAXgene Blood miRNA Kit	PreAnalytiX by Qiagen, Hilden
TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
TaqMan Universal PCR Master Mix II	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Megaplex™ RT Primers, Human Pool Set v3.0	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synth. Kit	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

---

### 3.1.2 Zellen

In dieser Arbeit wurde die eukaryote Zelllinie 293T (siehe 3.2.1.2.1), welche mit dem Adenovirus 5 transformiert wurde, sowie die erythro-leukämische Zelllinie K562 (siehe 3.2.1.2.2) verwendet. Außerdem wurde mit humanen, hämatopoetischen CD34-positiven Stammzellen (siehe 3.2.1.2.3), welche aus frischem, mit Hilfe des Zytokins G-CSF-mobilisiertem, peripherem Blut von Spendern der Blutgruppe A gewonnen wurden, gearbeitet.

### 3.1.3 Plasmide und virale Konstrukte

Für die Überexpression der miR-215, welche den Stemloop der miR-215-5p enthält, und die Hemmung der endogenen miR-215-5p wurde ein lentivirales Vektorsystem verwendet. Die Transfer-Plasmide wurden anschließend zusammen mit dem Capsid und einem viralem Hüllprotein in 293T-Zellen transfiziert.

**Tabelle 2: Plasmide und virale Konstrukte**

Bezeichnung	Firma/Firmensitz
Δ R8.74 Cl.2 (Capsid)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Peter Milanov (Institut für Transfusionsmedizin, DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen, Frankfurt am Main)
pMD2.G Cl.2 (virales Hüllprotein)	
pLV-[hsa-mir-215-5p]-locker Plasmid	Biosettia, San Diego
pLV-[hsa-mir-control]-locker Plasmid (locker-mock)	Biosettia, San Diego
pLV-[hsa-mir-215] Plasmid	Biosettia, San Diego
pLV-[hsa-mir-control] Plasmid (mock)	Biosettia, San Diego

### 3.1.4 Pre-microRNA und reife microRNA

**Tabelle 3: Pre-microRNA und reife microRNA**

Sequenz
<b>hsa-mir-215:</b> 5'-AUCAUUCAGAAAUGGUAUACAGGAAAUGACCUAUGAAUUGACAGACAAUUAUAGCU GAGUUUGUCUGUCAUUUCUUUAGGCCAAUAUUCUGUAUGACUGUGCUACUCAA-3'
<b>hsa-mir-215-5p:</b> 5'-AUGACCUAUGAAUUGACAGAC-3'

### 3.1.5 Primer und TaqMan microRNA-Assays

Alle in Tabelle 5 gelisteten Primer und TaqMan microRNA-Assays wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet.

**Tabelle 4: Primer und TaqMan microRNA Assays**

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3' Richtung/ Assay ID
Blutgruppe A – Probe	FAM – TGC TGA CAC CGT GTA GG – TAMRA
Blutgruppe A – Forward Primer	GGT CTA CCC CCA GCC AAA G
Blutgruppe A – Reverse Primer	GGT CAC CAC GAG GAC ATC CT
hGAPDH – Probe	FAM – TGT TGC CAT CAA TGA CCC CTT CAT TG – TAMRA
hGAPDH – Forward Primer	AGG GCT GCT TTT AAC TCT GGT AA
hGAPDH – Reverse Primer	CAT GGG TGG AAT CAT ATT GGA AC
RUNX1 – Probe	FAM – CCC TCT CTG CAG AAC T – TAMRA
RUNX1 – Forward Primer	TGC CAG CGG CAT GAC A
RUNX1 – Reverse Primer	TCG GGT GCC GTT GAG AGT
U6 – TaqMan microRNA-Assay	Assay-ID: 001973
miR-215-5p – TaqMan microRNA-Assay	Assay-ID: 000518

### 3.1.6 Zytokine

**Tabelle 5: Zytokine**

Bezeichnung	Firma/Firmensitz
EPO (recombinant human)	PeptoTech, Hamburg
IL-3 (recombinant human)	PeptoTech, Hamburg
SCF (recombinant human)	PeptoTech, Hamburg
TPO (recombinant human)	PeptoTech, Hamburg

### 3.1.7 Medien und Puffer

Tabelle 6: Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>PEI- Lösung (50 ml, pH 7.2)</b>	Destilliertes Wasser 50 mg PEI pH von 7.2 mit HCl (37,00 %) einstellen
<b>1,50 % Agar (500 ml)</b>	Luria-Broth (LB)-Medium 7,50 g Bacto-Agar 1 ml Ampicillin
<b>20 mM EDTA (500 ml, pH 7.2)</b>	Destilliertes Wasser 2,94 g EDTA pH von 7.2 mit 4 Natriumhydroxid-Plättchen einstellen
<b>293T-Zellen Kulturmedium</b>	DMEM + GlutaMAX 10,00 % FBS 1,00 % P/S
<b>FBS/ 20,00 % DMSO</b>	FBS 20,00 % DMSO
<b>LB-Medium (1 l, pH 7.5)</b>	Destilliertes Wasser 15,50 g LB-Pulver pH von 7.5 mit Natriumhydroxid einstellen
<b>PBS (1 x)</b>	Destilliertes Wasser 10,00 % PBS (10 x)
<b>PBS (1 x)/ 0,50 % BSA</b>	PBS (1 x) 0,50 % BSA
<b>PBS (1 x)/ 2 mM EDTA/ 0,50 % HSA- Puffer (pH 7.2)</b>	Destilliertes Wasser 10,00 % 20 mM EDTA 10,00 % PBS (10 x) 0,50 % HSA (20,00 %)

<b>RPMI-Medium</b>	RPMI 1640 10,00 % FBS 1,00 % L-Glutamin 1,00 % MEM-NEAA 1,00 % MEM-Natriumpyruvat
<b>Stammzellgrundmedium</b>	Iscove´s Basal Medium w/o L-Glutamine 1,00 % P/S 1,00 % L-Glutamine 5,00 % AB-Serum, heat-inactivated 0,55 % Holo-Transferrin (330 µg/ml) 0,10 % Insulin solution (10 µg/ml) 0,02 % Heparin (2 U/ml)
<b>Stammzellkultivierungsmedium</b>	Stammzellgrundmedium 0,10 % SCF (50 ng/ml) (Tag 3 – Tag 11) 0,01 % EPO (3 U/ml) (Tag 3 – Tag 15) 0,01 % Hydrocortisone (1 µM) (Tag 3 – Tag 8) 0,05 % IL-3 (5 ng/ml) (Tag 3 – Tag 8)
<b>Stammzelltransduktionsmedium</b>	StemSpan SFEM 0,50 % SCF (50 ng/ml) 0,10 % TPO (10 ng/ml) 0,05 % IL-3 (5 ng/ml)
<b>TE-Puffer (pH 8.3)</b>	steriles Wasser für Molekularbiologie 10,00 % 100 mM Trizma® HCl 1,00 % 100 mM EDTA
<b>Terrific Broth (TB)-Medium (1 l)</b>	Destilliertes Wasser 47,60 g Terrific Broth Pulver 8,00 % Glycerol 0,20 % Ampicillin (sodium salt 5 g)
<b>Wasch-Puffer für FACS-Analysen (FACS-Puffer) (pH 7.2)</b>	1 x PBS 25,00 % 20 mM EDTA 1,00 % FBS 0,09 % Natriumazid

### 3.1.8 Antikörper

**Tabelle 7: Antikörper**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma/Firmensitz</b>
APC Mouse Anti-Human CD235a (Glycophorin A)	BD Biosciences, Heidelberg
CD34 <sup>+</sup> - MicroBeads Kit 2 x 2 ml	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
FITC Mouse Anti-Human Blood Group A	BD Biosciences, Heidelberg
PE Mouse Anti-Human Blood Group A	BD Biosciences, Heidelberg
V450 Mouse Anti-Human CD45 Clone HI30	BD Biosciences, Heidelberg

### 3.1.9 Geräte

**Tabelle 8: Geräte**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma/Firmensitz</b>
A&D Weighing EK610i	A&D Engineering, San Jose
Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Biochrom™ NanoVue Plus Spectrophotometer	Biochrom, Berlin
FACS Aria™ II (Durchflusszytometer – Cellsorting)	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Canto II (Durchflusszytometer – Analyse)	BD Biosciences, Heidelberg
GeneAmp PCR System 9700	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Heraeus Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
MaxQ™ 4000	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Orion™ 2-Star Benchtop pH Meter	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Primo Vert Mikroskop	Carl Zeiss, Jena
QuadroMACS™	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
STEMvision™	StemCell Technologies, Köln
TC20™ Automated Cell Counter	Bio-Rad, München
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genius 3	IKA, Staufen

### 3.1.10 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma/Firmensitz</b>
3cc Syringes for Dispensing and Plating MethoCult	StemCell Technologies, Köln
Adhesion slides, Menzel-Gläser, Polysine®	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
BD DISCARDIT II Spritzen	BD Biosciences, Heidelberg
BD Falcon Polystyrene Round-Bottom Tube (5 ml, 14 ml)	Corning, Wiesbaden
BD Falcon Tubes (15 ml, 50 ml)	Corning, Wiesbaden
BD Plastipak (50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Blunt-End Needles, 16 Gauge with Luer Lock	StemCell Technologies, Köln
C-Chip Neubauer improved	NanoEnTek, Südkorea
Cell Counting Slides, Dual-Chamber	Bio-Rad, Frankfurt a. M.
CELLSTAR® Cell Culture Dishes, PS (145/ 20 mm)	Greiner, Kremsmünster
CELLSTAR® Cell Culture Flasks (T25, T75, T175)	Greiner, Kremsmünster
CELLSTAR® Cell Culture Plate (6 Well, 12 Well, 24 Well)	Greiner, Kremsmünster
CELLSTAR® Suspension Culture Flasks (T25, T75, T175)	Greiner, Kremsmünster
CELLSTAR® Suspension Culture Plate (6 Well, 12 Well)	Greiner, Kremsmünster
Culture Dishes (35 mm)	StemCell Technologies, Köln
Eppendorf Tubes (500 µl, 1500 µl, 2000 µl)	Eppendorf, Hamburg
epT.I.P.S.® Standard ( 0,1– 20 µL, 2– 200 µL, 50– 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Filteraufsatz "rapid"-Filtermax (250 ml, 500 ml)	Techno Plastic Products AG, Trasadingen
Filterkarten für Zytozentrifugation (Ø 9 mm)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Injekt® Solo Einmalspritze (20 ml)	B. Braun, Melsungen
LS-Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
MicroAmp Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Mikroreaktionsgefäße für Zytozentrifugation	VWR Chemicals, Dresden
Omnifix Luer Lock Solo Einmalspritzen (3 ml)	B. Braun, Melsungen
PAXgene Blood RNA Tube	PreAnalytiX by Qiagen, Hilden
PCR 8er-CapStrips	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
PCR-Tubes, ultradünn, 0,2 ml	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Pre-Separation Filters (30 µm)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Starlab, Hamburg

SmartDish (6 Well)	StemCell Technologies, Köln
Sterican® Einmal-Injektionskanülen Gr. 1	B. Braun, Melsungen
Syringe Filters, SFCA Membrane (0,20 µm, 0,45 µm Pore)	Corning, Wiesbaden
T311-Cryovial®, self-standing, round bottom (1,2 ml)	Simport, Saint-Mathieu-de-Beloil

---

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellkultur-Methoden**

#### **3.2.1.1 Isolation**

##### **3.2.1.1.1 Anreicherung von mononukleäre Zellen des peripheren Blutes mittels Dichtegradientenzentrifugation**

Aufgrund der unterschiedlichen Dichten der im peripheren Blut enthaltenen Bestandteile wurde eine Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) durchgeführt. So konnten sich das Blutplasma und Thrombozyten mit einer geringen Dichte, mononukleäre Zellen mit einer mittleren, sowie Erythrozyten und Granulozyten mit einer hohen Dichte in verschiedenen Phasen eines Zweistoff-Gemisches konzentrieren.

Bevor die DGZ durchgeführt wurde, wurden zur genauen Bestimmung der Blutgruppe 200 µl des bereitgestellten Stammzell-Apheresates (4 ml) abgenommen und an das humane Leukozyten-Antigen (HLA) -Labor des DRK-Blutspendedienstes Nord-Ost zur Untersuchung weitergeleitet. Das restliche Apheresat (ca. 3,80 ml) wurde in ein 50 ml Falcon-Tube überführt und mit einem 1 x PBS/ 2 mM EDTA/ 0,50 % HSA-Puffer auf 35 ml aufgefüllt. In ein 2. Falcon-Tube (50 ml) wurden 15 ml Biocoll (Dichte 1,077 g/l) vorgelegt und mit dem verdünnten Apheresat vorsichtig überschichtet. Die anschließende Zentrifugation (20 min, 796 x g, ohne Bremse) hatte zur Folge, dass die im Apheresat enthaltenen Erythrozyten und Granulozyten die Ficoll – Schicht passieren und sich als rotes Pellet absetzen. Außerdem lagerten sich das Blutplasma und Thrombozyten über dem Interphasenring an, welcher sich aus PBMCs bildete. Dieser entstandene milchige Interphasenring wurde abgenommen und in ein neues Falcon-Tube (50 ml) überführt. Anschließend wurde das Tube zweimal bis zur 50 ml – Markierung mit dem Puffer aufgefüllt, zentrifugiert (10 min, 1. Mal 287 x g, 2. Mal 127 x g) und nachfolgend der Überstand entfernt. Dies diente zur Entfernung des Biocolls, sowie der eventuell noch enthaltenen Thrombozyten und toten Zellen. Zum Schluss wurde das Pellet in 8 ml des Puffers aufgenommen und über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

##### **3.2.1.1.2 Isolation von CD34-positiven Stammzellen**

Zur Anreicherung von CD34-positiven (CD34<sup>+</sup>) Stammzellen wurden diese mit Antikörpern versetzt, die an magnetische MicroBeads gekoppelt sind. Die in einer Zellsuspension befindlichen Stammzellen wurden auf eine Trennsäule gegeben. Durch das Einspannen der Säule in das starke Magnetfeld des QuadroMACS war es möglich die magnetisch markierten CD34-positiven Zellen von unmarkierten zu

trennen. Nach der Entfernung aus dem Magnetfeld konnten die Stammzellen, welche das hämatopoetische Vorläuferzell-Antigen CD34 besitzen, aus der Säule gespült und aufgefangen werden.

Zu Beginn der Isolation wurde dazu die Zellzahl der am Vortag hergestellten Zellsuspension am Cell Counter bestimmt. Danach wurde die Suspension zentrifugiert (10 min, 300 x g), sowie der Überstand abgesaugt und eine auf die Zellzahl abgestimmte Volumenmenge an Puffer, FcR Blocking Reagenz und CD34<sup>+</sup> – MicroBeads hinzugegeben. Wichtig dabei war, dass das Pellet vor der Zugabe der MicroBeads mit der FcR Blocking Reagenz eine Minute inkubiert wurde. Nachdem darauffolgend alles gut vermischt wurde, erfolgte eine erneute Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4 – 8 °C. Im Anschluss wurde die Mischung auf die 50 ml – Markierung des Falcon-Tubes mit Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (10 min, 300 x g, mit Bremse). Währenddessen wurde eine LS – Säule in das Magnetfeld des QuadroMACS™ Separators eingespannt und äquilibriert. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Überstand der Zellsuspension abgesaugt und das Pellet in 2 ml Puffer aufgenommen. Diese Zellsuspension (2 ml) wurde darauffolgend auf die Säule gegeben und drei Mal mit Puffer gewaschen. Das erhaltene Eluat (CD34-negative Zellfraktion) wurde verworfen und die in der Säule befindlichen Zellen nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld mit Puffer selektiert. Die selektierten Zellen wurden zur Erhöhung der Reinheit auf eine zweite LS – Säule gegeben und anschließend ebenfalls drei Mal mit Puffer gewaschen, sowie selektiert. Danach erfolgte eine erneute Zellzählung.

Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (5 min, 300 x g) und währenddessen ein Kryoröhrchen mit 500 µl FBS/ 20,00 % DMSO vorbereitet. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in 500 µl FBS aufgenommen und ebenfalls in das Kryoröhrchen überführt. Nachdem alles gut vermischt wurde, erfolgte die Lagerung bei - 80 °C über Nacht. Am nächsten Tag fand die Überführung in den Flüssigstickstofftank statt, in dem die Probe bis zum Gebrauch gelagert wurde.

### **3.2.1.2 Kultivierung**

#### **3.2.1.2.1 Kultivierung der Zell-Linie 293T**

293T-Zellen, auch HEK293T-Zellen genannt, sind menschliche embryonale Nierenzellen, die zur Vermehrung von Adeno- und Lentiviren verwendet werden. Diese können außerdem, im Vergleich zu den HEK293-Zellen, das SV40 large T- Antigen exprimieren.

Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5,00 % CO<sub>2</sub> in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), welches neben einem hohen Glucose-Anteil auch 10,00 % FBS, 1,00 % Penicillin/ Streptomycin und 2 mM L-Glutamin enthielt. Dreimal wöchentlich wurden die Zellen 1:4 – 1:7 (je nach Zelldichte) passagiert. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und kurz mit Trypsin/ EDTA inkubiert. Durch Klopfen gegen die Zellkulturflasche wurden die Zellen schließlich abgelöst. Anschließend er-

folgten die Zugabe von frischem Serum-haltigem Medium und das Aussäen auf neue Zellkulturflaschen.

### **3.2.1.2.2 Kultivierung von K562-Zellen**

Die Zelllinie K562 ist die erste humane, immortalisierte und myeloische Leukämie-Zelllinie, die aus einer an chronischer myeloischer Leukämie erkrankten Patientin abgeleitet wurde (Klein, 1976).

Die Kultivierung der K562-Zellen erfolgte in RPMI-Medium bei 37 °C und 5,00 % CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden zweimal pro Woche 1:10 – 1:15 (je nach Zelldichte) gesplittet.

### **3.2.1.2.3 Kultivierung humaner CD34<sup>+</sup>-hämatopoetischer Stammzellen**

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen höherer Organismen, welche unbegrenzt Zellteilungen durchführen können (Zwahr, 2004). Unterschieden werden diese in embryonale und adulte Stammzellen. In dieser Arbeit wurden adulte Stammzellen aus frischem mobilisiertem peripherem Blut verwendet. Die Mobilisierung der Stammzellen erfolgte mit Hilfe des Zytokins G-CSF, welches bewirkt, dass sich die im Knochenmark befindlichen Stammzellen im Blutkreislauf konzentrieren (Molineux, 2012).

Nachdem die Stammzellen aus dem flüssigen Stickstoff aufgetaut waren, erfolgte die Kultivierung in einer 12-Well-Platte für 24 Stunden bei 37 °C und 5,00 % CO<sub>2</sub>. Pro Well befanden sich dabei  $1,5 \times 10^5$  Zellen in 1 ml Stammzelltransduktionsmedium. Nach der Transduktion erfolgte die Kultivierung der Stammzellen in Stammzellgrundmedium, wobei sich die Zugabe der Zytokine mit zunehmender Kultivierungsdauer änderte. An den Tagen 3 und 4 der Differenzierung wurden alle 4 Zytokine (SCF, EPO, HC und IL-3) und an Tagen 8 bis 11 nur SCF und EPO hinzugegeben. Am Tag 11 wurde auf das Zytokin SCF verzichtet und nur noch EPO verwendet. Nicht nur die Zugabe der Zytokine, sondern auch die Zellzahlen pro Milliliter für die Weiterkultivierung änderten sich im Verlauf der Differenzierung. An den festgelegten Auswertungstagen wurden mindestens  $1 \times 10^4$  Zellen/ml (Tag 3),  $1 \times 10^5$  Zellen/ml (Tag 8) bzw.  $1 \times 10^6$  Zellen/ml (Tag 11) weiterkultiviert. Lediglich an Tag 4 variierte die eingesetzte Zellzahl pro Milliliter innerhalb der verschiedenen Proben. Ausschlaggebend dafür waren die nach dem Sorting (siehe 4.2.2.4) erhaltenen mCherry- bzw. GFP-positiven Zellzahlen der einzelnen Proben.

## 3.2.2 molekularbiologische Methoden

### 3.2.2.1 Plasmid-Präparation

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde die Methode der Plasmid-Präparation angewendet. Dazu wurden zunächst Platten mit 1,50 % Agar gegossen. Nachdem der Agar fest geworden und abgekühlt war, wurden die Bakterien nach der Vereinzelmethode ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Pro Plasmid wurde am nächsten Tag je ein Klon von der Agar-Platte gepickt und in je 5 ml TB-Medium unter Zugabe von 50 mg/ml Ampicillin gegeben. Nach der darauffolgenden Inkubationszeit von acht Stunden bei 37 °C und 250 U/min im Tischorbitalschüttler wurde die Bakteriensuspension in 250 ml TB-Medium mit je 500 µl Ampicillin aufgenommen. Danach erfolgte die Übernachtkultivierung von mindestens 16 Stunden bei ebenfalls 37 °C und 250 U/min. Am Folgetag wurden die Bakterien in 250 ml-Röhrchen überführt und für 15 Minuten (4 °C, 4500 x g, mit Bremse) zentrifugiert. Nachfolgend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml Lysis-Puffer (Buffer P1) resuspendiert. Es folgte die Überführung in ein Falcon-Tube (50 ml) mit anschließender Zugabe von 10 ml Buffer P2 und eine guten Durchmischung. Im Anschluss an die Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden je 10 ml des kalten Buffer P3 zur Neutralisation hinzugegeben und ebenfalls gut resuspendiert. Nachdem die Inkubation (20 min, RT) und Zentrifugation (30 min, 4 °C, 4500 x g, mit Bremse) beendet war, wurde der Überstand in ein neues Falcon-Tube (50 ml) überführt. Bevor das Filtrat auf den QIAGEN-Tip 500 gegeben werden konnte, musste dieser vorher mit 10 ml Buffer QBT äquilibriert werden. Dazu wurde der dazu gehörige blaue Ring auf eine 200 ml Flasche gelegt und der Tip darauf gesteckt. Nach der Äquilibrierung wurde das Filtrat auf den Tip gegeben und zwei Mal mit dem Buffer QC gewaschen. Anschließend wurde der Tip auf ein 50 ml Falcon-Tube gesteckt, die DNA mit 15 ml des Buffer QF eluiert und nach Zugabe von 10,50 ml Isopropanol zentrifugiert (30 min, 4 °C, 4500 x g). Im Anschluss an die Zentrifugation wurde der Überstand abdekantiert und das Pellet in 70 %-igen Ethanol resuspendiert. Danach wurde noch einmal zentrifugiert (10 min, 4 °C, 4500 x g), der Überstand entfernt und das Pellet ca. 20 - 30 Minuten an der Luft unter sterilen Bedingungen getrocknet. Das luftgetrocknete, durchsichtige Pellet wurde in je 300 µl TE – Puffer aufgenommen und 15 Minuten bei 37 °C und 12 x g im MaxQ™ 4000 geschüttelt. Zum Schluss wurde die DNA-Konzentration bestimmt und die DNA bei - 20 °C eingefroren.

### 3.2.2.2 Virusproduktion

Die Virusproduktion diente der Herstellung von Lentiviren und die damit einhergehende Integration in die isolierten Stammzellen.

Zur Durchführung der Virusproduktion war es wichtig, mindestens  $3 \times 10^8$  293T-Zellen in Kultur zu haben. Diese wurden aus den Zellkulturflaschen abtrypsiniert und in Kultivierungsmedium ohne P/S (Kultivierungsmedium 293T-Zellen) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und  $7 \times 10^7$  Zellen in 50 ml Medium (pro Virus) aufgenommen. Danach wurden jeweils 5 ml der Zellsuspension in eine Petrischale mit 15 cm Durchmesser gegeben und 15 ml frisches Medium hinzugefügt. Nachdem die Platte geschwenkt und die Zellsuspension gut verteilt wurde, erfolgte die Kultivierung über Nacht (37 °C, 5,00 % CO<sub>2</sub>, 96,00 % Luftfeuchte). Am nächsten Tag wurde die Zelldichte bestimmt (ca. 80,00 % Konfluenz) und anschließend mit der Transfektion begonnen. Dazu wurden die benötigten Volumina an Verpackungsplasmiden, Transferplasmid für eine Schale (74,50 µg), sowie an PEI-Verbrauchslösung (223 µl), dessen Volumen im Verhältnis 3:1 zur DNA steht, berechnet. Nachdem das berechnete Volumen an PEI-Lösung in 1527 µl 293T-Zellen Kulturmedium aufgenommen wurde, erfolgte eine Inkubationszeit von 5 Minuten. Währenddessen wurde das berechnete Volumen an Verpackungsplasmiden zu der jeweiligen Menge an Transferplasmid gegeben. Nachdem die Inkubationszeit abgeschlossen war, wurde die PEI-Lösung zügig in die DNA-Lösung gegeben und gut vermischt. Nach einer erneuten Inkubationszeit (20 min, RT), wurden ca. 3,40 ml des Transfektionsmix' tropfenweise zu den Zellen gegeben und durch das Schwenken der Platte gut verteilt. Die Zellen wurden für 12 - 16 Stunden bei 37 °C (5,00 % CO<sub>2</sub>, 96,00 % Luftfeuchte) inkubiert und darauffolgend ein Mediumwechsel mit je 15 ml 293T-Zellen Kulturmedium mit P/S durchgeführt. 48 Stunden nach der Transfektion wurde der Virus geerntet. Dazu erfolgte die vorsichtige Abnahme des Überstandes von den adhärennten Zellen und die Überführung in ein 50 ml Falcon-Tube. Nach der Zentrifugation (5 min, 448 x g, RT) wurden die Überstände in eine 50 ml Spritze gegeben und durch einen 0,45 µm Sterilfilter filtriert. Anschließend erfolgte die Zugabe von einem Teil 5 x PEG-it Virus Precipitation Solution zu vier Teilen Virusüberstand. Danach wurde alles gut vermischt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag erfolgte zuerst die Zentrifugation (45 min, 1500 x g, 4 °C). Danach wurde der Überstand abdekantiert und das Pellet erneut zentrifugiert (5 min, 1500 x g, 4 °C). Nachdem der restliche Überstand vollständig entfernt wurde, wurden 100 µl PBS + 0,50 % BSA je Röhrchen hinzugegeben und anschließend resuspendiert, sowie eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Nachdem die Inkubationszeit beendet war, wurden die Pellets gepoolt und alle vier Pellets in ein 50 ml – Falcon-Tube überführt. Danach erfolgte das Aliquotieren und die Lagerung bei -80 °C.

### 3.2.2.3 Bestimmung des lentiviralen Titers mit K562-Zellen

Die Titerbestimmung zielte auf die Messung infektiöser Partikel am FACS-Gerät ab.

Dazu wurde zuerst die Zellzahl der K562-Zellen bestimmt und  $1,5 \times 10^5$  Zellen/Well in 400  $\mu$ l RPMI-Medium ohne P/S ausgesät, sowie über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag, zum Zeitpunkt der Transduktion, wurden die Zellen erneut gezählt. Anschließend wurden in ein Eppendorfer-Tube je 294  $\mu$ l RPMI-Medium, FCS und 3  $\mu$ l Polybrene vorgelegt. Dazu wurden 3  $\mu$ l des konzentrierten bzw. 1:5 und 1:10 des verdünnten Virus hinzu pipettiert und je 100  $\mu$ l der hergestellten Lösung zu den K562-Zellen gegeben. Nachdem die Tubes 30 Minuten ( $800 \times g$ ,  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ ) zentrifugiert wurden, erfolgte die Weiterkultivierung für 48 Stunden. Am darauf folgenden Tag wurde nochmals 500  $\mu$ l frisches RPMI-Medium hinzugegeben. Nach der 48 stündigen Kultivierung wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und 5 Minuten ( $300 \times g$ ) zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit je 1 ml Cellwash gewaschen und nach dem letzten Zentrifugationsschritt in 400  $\mu$ l Cellwash aufgenommen. Die Messung der Grün- bzw. Rotfluoreszenz wurde am FACS-Canto II durchgeführt. Im Anschluss der Messung wurde der Titer, der für die Transduktion benötigt wird mit Hilfe der Gleichung 1 kalkuliert.

Gleichung 1

$$\text{Titer} \left[ \frac{\text{MOI}}{\text{ml}} \right] = \text{ausplattierte Zellzahl zur Transduktion} \cdot \frac{\text{Anteil an transduzierten Zellen}}{\text{eingesetzte Virusmenge [ml]}}$$

### 3.2.2.4 Transduktion

Als Transduktion wird der Gentransfer in Zellen durch das Einwirken von Viren bezeichnet. Durch das Einschließen von Genen in das Capsid der Viren können diese nach der Zellyse andere Zellen ebenfalls infizieren und somit das in das Capsid eingeschlossene Gen übertragen. Dazu erfolgte am „Tag 0“ das Auftauen der Stammzellen. Dabei wurden diese in 25 ml Iscove's Basal Medium aufgenommen und zentrifugiert (5 min,  $199 \times g$ , RT). Anschließend wurde das Pellet in 1 ml Stammzelltransduktionsmedium aufgenommen. Nachdem die Zellzahl bestimmt wurde, wurden die Zellen mit einer Konzentration von  $1,5 \times 10^5$  Zellen/Well in eine 12-Well-Platte pipettiert und in jedes Well 1 ml Stammzelltransduktionsmedium hinzugegeben. Nach dem die Zellen für 24 Stunden kultiviert wurden, wurden die entsprechenden Viren (hsa-mir-215, hsa-mir-control, hsa-mir-215-5p-locker und

hsa-mir-control-locker) in die jeweiligen Wells hinzugegeben. Anschließend wurde die Platte zentrifugiert (30 min, 800 x g, 32 °C) und für 48 h inkubiert. Jedoch erfolgte bereits nach 24 Stunden die Zugabe von 1 ml frischem Transduktionsmedium. 48 Stunden nach der Transduktion wurden die Proben unter dem Mikroskop auf Reinheit und Fluoreszenz kontrolliert und anschließend in 10 ml Iscove's Basal Medium überführt. Danach wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 199 x g, RT) und das Pellet erneut mit Iscove's Basal Medium gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand des Pellets entfernt und das Pellet in 1 ml frischen Kultivierungsmedium resuspendiert. Die transduzierten Zellen wurden danach mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt und die Zellzahl mit Hilfe Gleichung 2 bestimmt. Anschließend wurden die Zellen mit einer Konzentration von  $1,5 \times 10^4$  Zellen/ml ausgesät und 24 Stunden weiterkultiviert. Am 4. Tag wurde die Zellsuspension zuerst aus der Zellkulturflasche in ein 50 ml – Falcon-Tube überführt, zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet schließlich in wenigen Millilitern Kultivierungsmedium aufgenommen. Danach wurde das gesamte Volumen auf jeweils einen Pre-Separationsfilter gegeben und der Filter mit 1 ml Kultivierungsmedium gespült. Die Proben wurden in Vorbereitung auf das Cellsorting am FACS zentrifugiert (5 min, 199 x g, RT) und das Pellet in 300 µl Kultivierungsmedium resuspendiert. Nachdem die Zellen gesortet wurden, wurde die daraus ermittelte Zellzahl an GFP- bzw. mCherry-positiven Zellen zur Berechnung der Zellvolumina für den CFU-Assay verwendet. Bis Tag 8 erfolgte die Kultivierung von  $1 \times 10^4$  Zellen/ml. An Tag 7 wurde noch einmal frisches Kultivierungsmedium hinzu gegeben. An Tag 8, 11 und 15 wurden sowohl die FACS-Analyse, als auch der Zytospin durchgeführt. Außerdem wurden am Tag 11 Zellen für die RNA-Isolation abgenommen und bei -80 °C gelagert.

Gleichung 2

$$\frac{\text{Zellzahl}}{4} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 1000 = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

### **3.2.3 Analysemethoden**

#### **3.2.3.1 Durchflusszytometrische Analyse**

Mithilfe der Durchflusszytometrie konnte eine genaue Analyse des Expressionsmusters der Oberflächenantigene durchgeführt werden. Dazu wurden differenzierte Stammzellen verwendet, welche sich jeweils an Tag 8, 11 und 15 der Differenzierung zu Erythrozyten befanden. Dazu wurden je  $1 \times 10^5$  Zellen pro Probe in 100  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer aufgenommen und mit 1  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Antikörper versehen. Die eingesetzten Konzentrationen der Antikörper variierten aufgrund der fortschreitenden Differenzierung der Zellen. Der Antikörper „V450 Mouse Anti-Human CD45 Clone HI30“ (CD45-V450) wurde unverdünnt, die beiden Blutgruppe A – Antikörper „PE Mouse Anti-Human Blood Group A“ (BGA-PE) mit einer 1:5 Verdünnung, bzw. „FITC Mouse Anti-Human Blood Group A“ (BGA-FITC) mit einer 1:10 Verdünnung zu den Proben gegeben. Die Verdünnungen des „APC Mouse Anti-Human CD235a“ – Antikörpers (Glycophorin A) betragen am Tag 8 1:10, am Tag 11 1: 50 und am Tag 15 wurde sogar eine 1:400 Verdünnung auf die Proben gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubationszeit von 25 Minuten bei Raumtemperatur, jedoch im Dunkeln. Danach wurde 1 ml FACS-Puffer hinzugegeben und die Proben zentrifugiert (5 min, 300 x g, RT). Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, erfolgte die Resuspension des Pellets in 400  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer. Danach wurden die Proben am Durchflusszytometer analysiert und die Ergebnisse mit Hilfe der Software „FlowJo“ ausgewertet.

#### **3.2.3.2 CFU-Assay**

Der CFU-Assay diente der Bestimmung der Anzahl von koloniebildenden Zellen und zeigte auf, wie stark sich die Zellen in CFU-Es, BFU-Es, CFU-Gs und CFU-GEMMs differenzierten. Dazu wurden ausschließlich GFP- bzw. mCherry-positive Zellen verwendet, die vorher am FACS gesortet wurden. Danach wurden 4 ml des MethoCult-Medium und 44  $\mu\text{l}$  Penicillin/ Streptomycin (P/S) in ein 14 ml Falcon Polystyrene Round-Bottom Tube gegeben. Die Stocklösungen wurden aus den nach Gleichung 3 berechneten Volumina, welche anschließend mit Iscove´s Modified Dulbecco-Medium + 2,00 % FBS auf 1000  $\mu\text{l}$  aufgefüllt wurden, hergestellt. Aus diesem Stock wurden 400  $\mu\text{l}$  entnommen und in das MethoCult mit P/S gegeben. Nachdem alle Proben gut gevortext und zur Vermeidung von Blasen fünf Minuten ruhen gelassen wurden, wurden pro Well 1,1 ml mithilfe einer Spritze mit Bluntend-Kanüle ausgesät. Nachdem das Medium gleichmäßig in den Wells verteilt wurde, erfolgte eine Inkubationszeit von zwei Wochen bei 37 °C und 5,00 % CO<sub>2</sub>. Die Zellzahl pro Well betrug 250 Zellen. Nach 2 Wochen wurde der CFU-Assay am STEMvision™ ausgewertet.

### Gleichung 3

$$\text{Zellvolumen} = \frac{10 \times \text{eingesetzte Zellzahl} \cdot \text{Kultivierungsvolumen bezogen auf die gesortete Zellzahl}}{\text{Anzahl der gesorteten Zellen}}$$

#### 3.2.3.3 Zytospin

Die Zytospin-Präparation diente der mikroskopischen Beurteilung der Zellen. Dabei wurden diese durch Zentrifugalkraft auf einen Objektträger fixiert. Infolge dessen wurden die Zellen mit May-Grünwald- und 1:20 verdünnter Giemsa-Lösung gefärbt und untersucht. Ziel war es, den Fortschritt der Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen aus mobilisiertem Peripherblut zu Erythrozyten mikroskopisch zu untersuchen. Der Zytospin setzte sich aus zwei Teilschritten zusammen, der Durchführung des Zytospins und der anschließenden Färbung zur besseren Beurteilung der Zellen. Zuerst wurde die Zytospinvorrichtung, bestehend aus Objekt- und Gefäßträger, Filterkarte und Zyto-Container mit Mikrogefäßen mit Bodenloch, zusammengesetzt und die Filterkarte befeuchtet. Dazu wurden 150 µl 1 x PBS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> in die Mikrogefäße pipettiert und anschließend zentrifugiert (2 min, 199 x g, mit Bremse). Danach wurden 2,5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Probe abgenommen und nach kurzer Zentrifugation in 150 µl 1 x PBS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> aufgenommen. Darauf folgend wurden die Proben in die Mikrogefäße der Zyto-Container gegeben und zentrifugiert (5 min, 50 x g, ohne Bremse). Nachdem die Objektträger mindestens fünf Stunden an der Luft trocknen mussten, konnte mit der Färbung begonnen werden. Dazu wurden zunächst 1000 µl konzentrierte May-Grünwald- Lösung auf die Objektträger gegeben und drei Minuten inkubiert. Nach anschließendem einminütigen Waschen in destilliertem Wasser, wurde das Präparat 20 Minuten mit verdünnter Giemsa-Lösung (1:20) überschichtet. Nach erneutem einminütigen Waschen in destilliertem Wasser und kurzem Schwenken in 80 prozentigen Ethanol, konnte mit der mikroskopischen Beurteilung begonnen werden.

### 3.2.3.4 RNA-Isolation

Die Isolation der RNA aus den Zellen ist für viele weitere Analysemethoden unumgänglich. Dabei wurden die Zellen in einer für RNAsen schädlichen Lösung lysiert, damit diese Enzyme die Phosphodiesterbindungen der im Lysat enthaltenen RNA nicht abbauen können. Mit Hilfe von Adsorption an einer Silicagel-Membran wurde die RNA anschließend von den zellulären Bestandteilen des Lysats getrennt und mit Isopropanol präzipitiert. Nach mehreren Waschschrritten konnte die reine RNA eluiert und für weitere Analyseschritte verwendet werden (Qiagen, 2015).

Für die RNA-Isolation wurden die Pellets der jeweiligen Proben, welche aus  $2 \times 10^6$  Zellen bestanden und bei  $-80\text{ °C}$  bis zur Verwendung gelagert wurden, in 2 ml des 1 x PBS gelöst und anschließend in PAXgene Blood RNA Tubes gegeben. Nachdem die Röhrchen mehrmals geschwenkt wurden, erfolgte die Zelllyse während einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei RT. Darauffolgend wurden die PAXgene-Röhrchen zehn Minuten bei  $4000 \times g$  zentrifugiert und der Überstand durch Absaugen entfernt. Anschließend wurden die Pellets in 4 ml destilliertes Wasser für Molekulargenetik gelöst, erneut zentrifugiert und die Überstände ebenfalls entfernt. Durch das Vortexen wurden die Pellets in 350  $\mu\text{l}$  Buffer BM1 gelöst, in jeweils einen Eppendorfer Tube mit einem Volumen von 1,50 ml überführt und jeweils 300  $\mu\text{l}$  BM2, sowie 40  $\mu\text{l}$  der Proteinase K zu jeder Probe hinzugegeben. Nachdem die Proben ganz kurz gevortext wurden, wurden sie im Thermomixer comfort für zehn Minuten ( $55\text{ °C}$ , 650 rpm) geschüttelt. Im Anschluss daran wurden die Proben jeweils auf eine Shredder-Säule, welche sich auf einem Processing Tube befand, gegeben und drei Minuten ( $20000 \times g$ ) zentrifugiert. Die Überstände der jeweiligen Proben wurde in ein neues 1,50 ml – Tube überführt, mit 700  $\mu\text{l}$  Isopropanol versetzt und kurz zentrifugiert ( $1000 \times g$ ). Anschließend wurden je 700  $\mu\text{l}$  der Probe entnommen, in eine RNA-Säule überführt und für eine Minute bei  $20000 \times g$  zentrifugiert. Danach wurde dieser Schritt mit dem restlichen Probevolumen, welches ebenfalls auf die RNA-Säule gegeben wurde, wiederholt. Nachdem die Zentrifugation abgeschlossen war, wurden je 350  $\mu\text{l}$  Buffer BM3 auf die Säulen gegeben und erneut bei unveränderten Einstellungen (1 min,  $20000 \times g$ ) zentrifugiert. Im Anschluss wurden auf jede Säule 10  $\mu\text{l}$  DNase I Stocklösung und 70  $\mu\text{l}$  Buffer RDD pipettiert und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Nachdem auf die Säulen 350  $\mu\text{l}$  Buffer BM3 gegeben und diese anschließend zentrifugiert wurden, erfolgte zwei Mal die Zugabe von je 500  $\mu\text{l}$  Buffer BM4 mit anschließender Zentrifugation. Um den Waschpuffer vollständig zu entfernen, wurde die Säule noch einmal ohne Flüssigkeit trocken zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  Wasser direkt auf die Säulen-Membranen mit anschließender Inkubationszeit von fünf Minuten bei RT, sowie Zentrifugation. Dieser Schritt wurde darauffolgend noch einmal wiederholt. Im letzten Schritt wurden die Eluate für fünf Minuten bei  $65\text{ °C}$  (650 rpm) geschüttelt und danach sofort auf Eis gestellt. Die RNA-Konzentrationen [ $\text{ng}/\mu\text{l}$ ] wurden am Biochrom™ NanoVue Plus Spectrophotometer gemessen. Bis zur weiteren Verwendung der Proben wurden diese bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

### 3.2.3.5 Reverse Transkription

Die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus einzelsträngiger RNA mit Hilfe von RNA-abhängiger DNA Polymerase wird reverse Transkription genannt. Dabei lagert sich der Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer an den komplementären Poly-A-Schwanz des 3'Endes der mRNA an. Nach anschließender Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und dem Umschreiben in cDNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, liegt ein hybridisiertes Produkt aus einzelsträngiger cDNA und RNA vor. Durch den Einsatz von Ribonukleasen und Polymerasen kann der RNA-Strang abgebaut und ein komplementärer DNA-Strang zum cDNA-Einzelstrang synthetisiert werden (New England Biolabs, 2017).

Für die reverse Transkription wurden die RNA-Proben von acht Tage differenzierten Stammzellen verwendet. Dazu wurden zwei verschiedene Mastermix' angesetzt. Der erste Mastermix wurde mit einem Volumen von 9 µl angesetzt, der je Probe 1 µl Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer, 1 µl RoLock RNase Inhibitor und RevertAid H Minus Reverse Transkriptase, 2 µl 10 mM dNTP-Mix, sowie 4 µl 5-fach Reaktionspuffer beinhaltete. Dazu wurden je 200 ng der entsprechenden isolierten RNA-Probe hinzugegeben und auf ein Volumen von 11 µl mit sterilem Wasser für Molekulargenetik ergänzt. Das Umschreiben der mRNA-Ansätze erfolgte mit Hilfe folgendes PCR-Programms: 1. Schritt: 5 Minuten bei 25 °C; 2. Schritt: 60 Minuten bei 42 °C; 3. Schritt: 5 Minuten bei 70 °C.

Der zweite Mastermix zum Umschreiben der miRNA beinhaltete pro Probe je 1 µl der MultiScribe Reversen Transkriptase, 0,15 µl 100 mM dNTP-Mix, 1,5 µl Reverse Transkriptase Buffer und 0,19 µl RNase Inhibitor. Dazu wurden je 1,5 µl der MegaPlex Primer aus Pool A und Pool B, sowie 200 ng der entsprechenden isolierten RNA-Probe hinzugegeben und auf ein Gesamtvolumen von 15 µl mit sterilem Wasser für Molekulargenetik ergänzt. Im Anschluss erfolgte das Umschreiben der miRNA durch das folgende PCR-Programm: 1. Schritt: 30 Minuten bei 16 °C; 2. Schritt: 30 Minuten bei 42 °C; 3. Schritt: 5 Minuten bei 85 °C.

### 3.2.3.6 Real-time PCR

Im Vergleich zur herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion, bei der erst am Ende der Reaktion die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgt, wird diese bei der Real-Time-PCR über die gesamte Reaktionszeit und nach jedem Zyklus vorgenommen. Der Echtzeitnachweis geschieht dabei die Messung des Fluoreszenz-Signals nach jedem Zyklus, wobei sich die gemessene Fluoreszenzintensität proportional zur Gesamtmenge an Amplicons verhält (Bio Rad, 2017).

Dazu wurde für die Real-time PCR durch die reverse Transkription erhaltenen cDNAs von acht Tage kultivierten und mit microRNA transduzierten Stammzellen zwei verschiedene Mastermix' angesetzt.

Der Mastermix für die cDNAs der microRNA-Proben enthielt 20 µl steriles Wasser, 25 µl des TaqMan Universal PCR Master Mix', sowie jeweils 2,50 µl des TaqMan MicroRNA Assays und der cDNA.

Dahingegen enthielt der Mastermix für die Untersuchungen den BGA-, RUNX1- und GAPDH Primern je 14,5 µl steriles Wasser, 5 µl der entsprechenden, 1:50 verdünnten FAM-TAMRA-Probe, 2,5 µl der cDNA, 25 µl des TaqMan Universal PCR Master Mix', sowie je 1,5 µl des 1:10 verdünnten Forward- und Reverse-Primers. Im Anschluss daran wurde der entsprechende Mastermix der jeweiligen Probe in Doppelbestimmung mit einem Gesamtvolumen von je 20 µl pro Well auf eine 96-Well Platte überführt. Die Proben wurden mit folgendem Programm analysiert: 1. Schritt: 10 Minuten bei 95 °C; 2. Schritt: 15 Sekunden á 40 Zyklen bei 95 °C; 3. Schritt: 60 Sekunden bei 60 °C.

Die aus der Real-time PCR erhaltenen Daten wurden anschließend mittels Delta-Delta-C<sub>t</sub> ( $\Delta\Delta C_t$ )-Methode analysiert. Bei dieser Methode wurde zuerst der Delta-C<sub>t</sub>- ( $\Delta C_t$ ) Wert ermittelt (Gleichung 4), welcher sich aus der Expression eines Zielgens in Bezug auf ein konstant exprimiertes und nicht reguliertes Referenzgen (Housekeeping-Gen), der GAPDH, ergibt. Im Anschluss daran wurde der Delta-Delta-C<sub>t</sub>-Wert (Gleichung 5) berechnet. Dazu wurde vom Delta-C<sub>t</sub>-Wert des zu untersuchenden Gens der Delta-C<sub>t</sub>-Wert einer Kontrollprobe subtrahiert. Indem der Delta-Delta-C<sub>t</sub>-Wert (Gleichung 6) anschließend als negativer Exponent zur Basis 2 gesetzt wurde, konnte die Berechnung des Expressionsunterschiedes zwischen dem Ziel und der Kontrolle erfolgen (Applied Biosystems, 2004).

Gleichung 4

$$\Delta C_t = C_t\text{-Wert des Zielgens} - C_t\text{-Wert des Housekeeping-Gens}$$

Gleichung 5

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t\text{-Wert des Zielgens} - \Delta C_t\text{-Wert der Kontrollprobe}$$

Gleichung 6

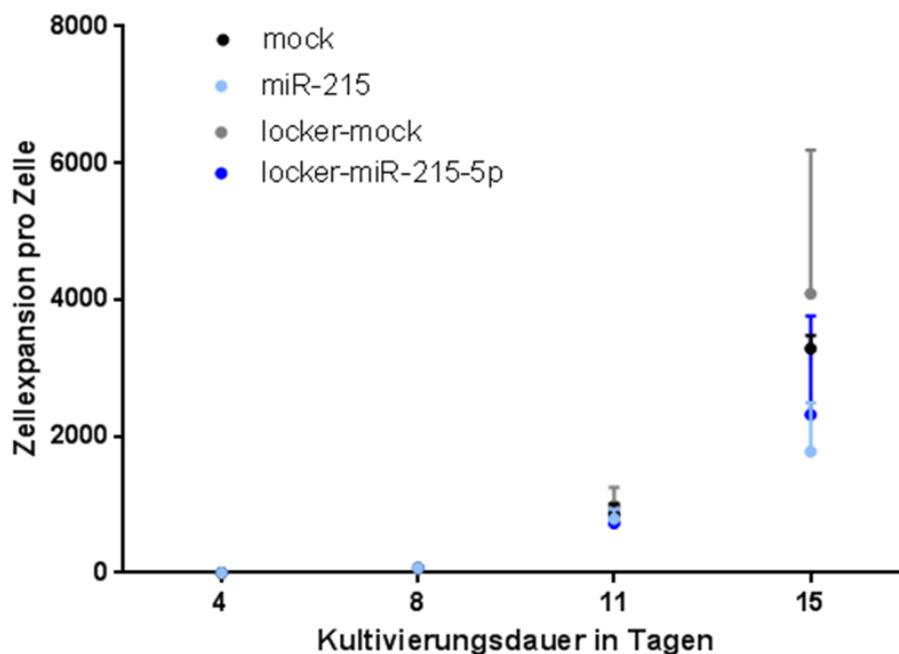
$$\text{Expressionsunterschied} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

## 4. Ergebnisse

Bereits in den Vorarbeiten mit dem Thema „Die Rolle des Transkriptionsfaktors RUNX1 bei der Regulation des Blutgruppe A-Antigens im Verlauf der Erythropoese“ (Schmidt, 2017)(Anhang A) wurden shRNAs gegen RUNX1 mit Hilfe eines lentiviralen Vektorsystems in hämatopoetische Stammzellen gebracht. Die Zellen wurden anhand des im Vektor enthaltenen Fluoreszenzgens GFP gesortet und zu erythroiden Zellen differenziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Proliferation durch die Hemmung von RUNX1 herunterreguliert wurde. Des Weiteren ging aus den Versuchsergebnissen hervor, dass die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen durch die Anwesenheit von RUNX1 nicht wesentlich beeinflusst wird, wohingegen die myeloische Differenzierung zunimmt. Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Hemmung der Proliferation nicht durch eine gesteigerte Differenzierung zu Erythrozyten verursacht wurde. Auch konnte anhand der durch die FACS-Analyse erhaltenen Daten eine Abnahme der Expression des Blutgruppe A-Antigens innerhalb der Glycophorin-A-positiven erythroiden Fraktion festgestellt werden. Die quantitative Auswertung ergab, dass bei beiden shRNAs, shRUNX1-1C besser als -1B, sowohl die Anzahl der Blutgruppe A-positiven Zellen, als auch die Anzahl der A-Antigene pro Zelle signifikant verringert wurden. Im Anschluss erfolgte noch die Analyse auf mRNA-Ebene mittels qPCR. Dabei wurde geschaut, wie stark RUNX1 herunterreguliert wurde und welchen Einfluss die Herunterregulierung genau auf die mRNA der Glycosyltransferase A hat. Mit Hilfe der erhaltenen Daten (Anhang A - Abb. 11 E, F) konnte nachgewiesen werden, dass beide shRNAs, dabei shRUNX1-1B stärker als shRUNX1-1C, zu einer Herunterregulierung der RUNX1-mRNA führten. Dahingegen wurde die mRNA der Glykosyltransferase A deutlich gesteigert.

## 4.1 Der Einfluss der miRNA-215-5p auf die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss der microRNA-215-5p auf die Proliferation und Differenzierung der CD34<sup>+</sup>- hämatopoetischen Stammzellen genauer untersucht. Dazu wurde zum einen die pre-miR-215 in HSCs überexprimiert und zum anderen die endogen vorhandene miR-215-5p mittels einer locker-miRNA herunterreguliert. Zuerst wurde die Analyse der Proliferation vorgenommen und überprüft, inwiefern sich die Proliferationsrate, bzw. die Zellexpansion mit zunehmender Kultivierungsdauer bezogen auf eine einzige hämatopoetische Stammzelle verändert.



**Abbildung 1: Darstellung der Zellexpansion im Verlauf der Erythropoese**

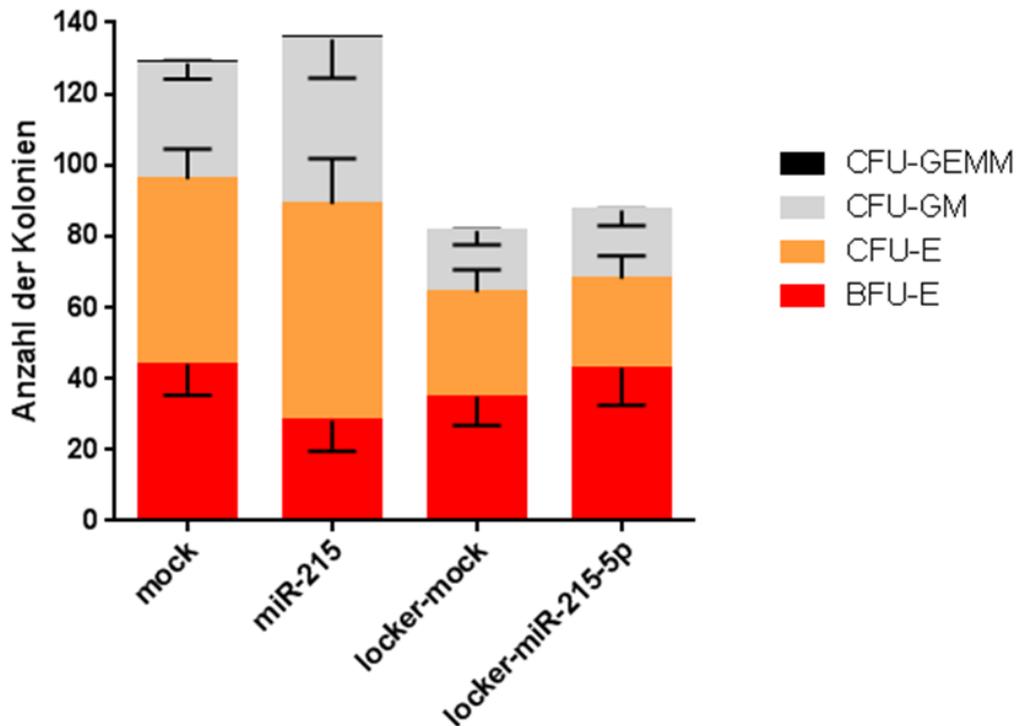
Dargestellt ist die Zellexpansion bezogen auf eine hämatopoetische Stammzelle. Daten sind von N = 3 Versuchen als Mittelwert und mit dem Standard Error Mean (SEM)-Wert dargestellt.

**Tabelle 10: Mittelwerte und Standardabweichung der Zellexpansionen (Anhang A) bezogen auf eine hämatopoetische Stammzelle, N = 3 unabhängige Spender**

Probe	Mittelwert				Standardabweichung			
	Tag 4	Tag 8	Tag 11	Tag 15	Tag 4	Tag 8	Tag 11	Tag 15
mock	1	77	848	3286	0	11	288	321
miR-215	1	78	792	1777	0	12	247	1237
locker-mock	1	65	983	4088	0	19	469	3645
locker-miR-215-5p	1	62	729	2318	0	21	318	2510

Anhand der graphischen Darstellung der Zellexpansionen (Abb.1) und unter Betrachtung der Zellexpansionen im Mittel (Tab.1), können an Tag 8 keine Unterschiede erkannt werden. So entwickelte sich aus einer, am Tag 4 eingesetzten Zelle in der mock-Probe  $77 \pm 11$  Zellen, wohingegen eine mit der miR-215 transduzierten Zelle eine Expansion von  $78 \pm 12$  Zellen aufweisen konnte. Auch beim Blick auf die Locker-Plasmide (locker-mock und locker-miR-215-5p) konnten keine Divergenzen festgestellt werden. An Tag 11 der Kultivierung können der Grafik erneut keine Unterschiede und Veränderungen der Proliferation entnommen werden. Allerdings ist es anhand der ermittelten Mittelwerte (Tab. 1) möglich, eine 10 – 15-fache Steigerung der an Tag 8 erhaltenen Zellzahl am 11. Kultivierungstag zu erkennen. Erst an Tag 15 der Differenzierung können sich tendenzielle Unterschiede sowohl durch die graphische Darstellung, als auch mit Hilfe der ermittelten Expansionsraten im Mittel erkennen lassen. Während sich in der mock-Kontrolle innerhalb von 15 Tagen aus einer Zelle  $3286 \pm 321$  Zellen differenziert haben, beläuft sich die Zellexpansion nach Transduktion der miR-215 nur auf  $1777 \pm 1237$  Zellen. Mit Hilfe der erhaltenen Daten kann eine tendenziell signifikante Hemmung der Proliferation, bewirkt durch die Überexpression der miR-215, festgestellt werden. Die Herunterregulierung der endogenen miR-215-5p (locker-miR-215-5p) bewirkte an Tag 15 eine Proliferationsrate von  $2318 \pm 2510$  Zellen, wohingegen in der Locker-Kontrolle innerhalb der 15 tägigen Kultivierung aus einer hämatopoetischen Stammzelle  $4088 \pm 3645$  Zellen entstanden. Dadurch geht hervor, dass auch die Herunterregulation der endogenen miR-215-5p keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Proliferation ausübt, was auch den sehr hohen Standardabweichungen innerhalb beider Proben geschuldet ist.

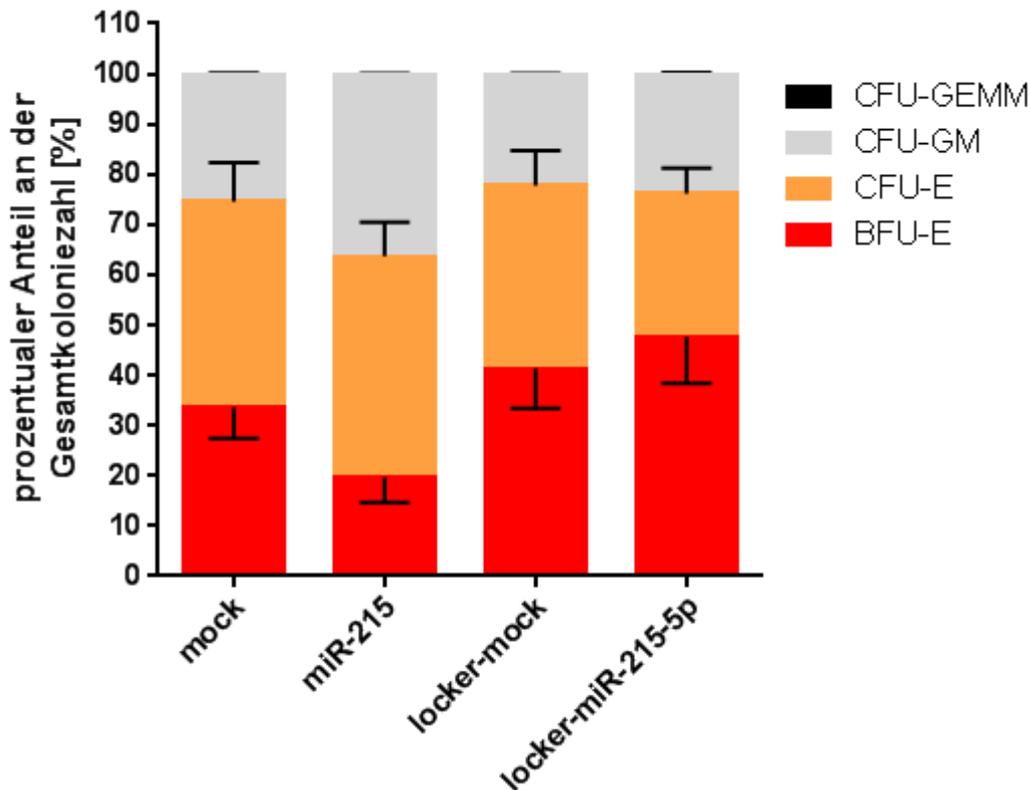
Als nächstes erfolgte die Analyse der Differenzierung anhand der durchgeführten CFU-Assays. Dazu erfolgte die Beurteilung von Veränderungen der Gesamtkolonieanzahl und des Verhältnisses der verschiedenen Koloniearten in Bezug auf die Gesamtkoloniezahl, die durch den Einsatz der miR-215 und locker-miR-215-5p im Vergleich zu ihren Kontrollproben, herbeigeführt wurden. Außerdem sollte die Analyse der CFU-Assays Aufschluss darüber geben, ob die Hemmung der Proliferation durch die miR-215 mit einer ebenfalls gehemmten Differenzierung einhergeht.



**Abbildung 2: Graphische Darstellung der Anzahl der verschiedenen Kolonie-Arten**

Gezeigt sind die Gesamtkolonieanzahl, sowie die Verteilung der einzelnen Koloniearten innerhalb der Gesamtkoloniezahl. Es wurden jeweils Triplikate pro Spender ausgewertet. N = 4 unabhängige Spender.

Unter Betrachtung der Gesamtkolonieanzahl (Abb.2) konnte festgestellt werden, dass der pLV-miRNA-Vektor eine deutlich gesteigerte Koloniebildung herbeiführte, als durch den Einsatz des pLV-miR-Locker-Plasmids verursacht werden konnte. Die Proben mock und miR-215 kennzeichnen sich durch einen lentiviralen Vektor (pLV-miR-Vektor), welcher ein mCherry-fusioniertes Puromycin-Resistenzgen enthält. Indes beinhalten die Locker-Plasmid-Vektoren (pLV-miR-Locker-Vektor) ein GFP-fusioniertes Blasticidin-Fluoreszenzgen. Des Weiteren konnte in der miR-215-Probe im Vergleich zu ihrer Kontrolle (mock) kein Einfluss auf die Anzahl der Gesamtkolonien festgestellt werden. Bei der Gegenüberstellung beider Proben ergaben sich Abweichungen in der Anzahl an myeloiden Kolonien (CFU-GM und CFU-GEMM). Diese Fraktion fällt bei der miR-215 mit  $46 \pm 10$  Kolonien innerhalb der vier durchgeführten CFU-Assays tendenziell höher aus, als bei ihrer mock-Kontrolle ( $33 \pm 10$  Kolonien). Bei der Betrachtung der locker-Plasmide fällt ebenfalls auf, dass sich die Gesamtkoloniezahlen nach der Hemmung der endogenen miR-215-5p ( $87 \pm 32$  Kolonien) und der locker-mock-Kontrolle ( $81 \pm 25$  Kolonien) nicht signifikant voneinander unterscheiden. Daher erfolgte im Anschluss die Auswertung des prozentualen Anteils der verschiedenen Koloniearten, bezogen auf die normierten Gesamtkolonieanzahlen. Somit sollten sich eventuell klarere Unterschiede zwischen den Proben aufgrund von Überexpression der miR-215 und des Knockdowns der endogenen miR-215-5p herauskristallisieren.

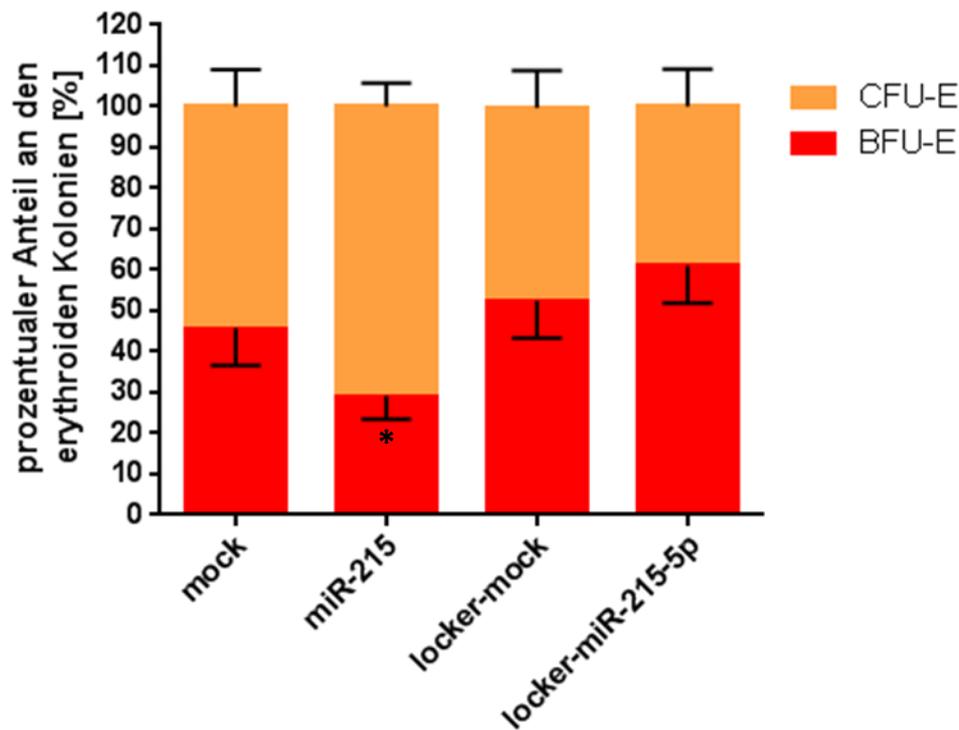


**Abbildung 3: Prozentualer Anteil der jeweiligen Kolonie-Art an der Gesamtkoloniezahl**

Gezeigt sind die prozentualen Anteile der verschiedenen Koloniearten an der auf 100 % normierten Gesamtkoloniezahl. Es wurden jeweils Triplikate pro Spender ausgewertet. N = 4 unabhängige Spender. Die statistische Auswertung erfolgte mittels student t- Test. Für die Standardbalken wurde der SEM-Wert verwendet.

Mit Hilfe der Datenanalyse zum Proben-spezifischen prozentualen Kolonieanteil bezogen auf die Gesamtkoloniezahl (Abb. 3) konnten deutlichere Veränderungen festgestellt werden. Zuerst wurden die Proben der mock und der miR-215-Überexpression miteinander verglichen. Dabei ließ sich ein  $26 \pm 8$  prozentiges myeloides und  $74 \pm 9$  prozentiges erythroides Segment an Kolonien der mock-Kontrolle feststellen. Die CFU-Assays der miR-215-Überexpression wiesen im Vergleich dazu einen Anteil an erythroiden Zellen von  $66 \pm 12$  % auf. Der Anteil an myeloiden Kolonien nahm  $34 \pm 7$  % der Gesamtkoloniezahl ein. Es konnte auch festgestellt werden, dass die Anzahl an gemischten Kolonien (CFU-GEMM) aller Proben so gering war, dass er keinen Einfluss innerhalb der graphischen Darstellung zeigt. Mit Hilfe der erhaltenen Daten des CFU-Assays konnte ein erhöhter prozentualer Anteil von myeloiden Kolonien durch die Überexpression der microRNA-215 im Vergleich zur ihrer mock-Kontrolle festgestellt werden. Der Vergleich beider Locker-Plasmide zeigte, dass die prozentualen Anteile der erythroiden und myeloiden Fraktionen keine Unterschiede ergaben. Zusammenfassend konnte anhand dieser graphischen Darstellung festgestellt werden, dass die endogene miR-215-5p keinen Effekt auf die vermehrte Bildung von erythroiden oder myeloiden Kolonien hat. Da aus der Graphik jedoch hervorgeht, dass Unterschiede innerhalb der erythroiden Fraktionen aller Proben,

bezogen auf die Verteilung der großen erythroiden Kolonien (BFU-E) und kleinen erythroiden Kolonien (CFU-E), zu finden waren, wurde der prozentuale Anteil der CFU-Es und BFU-Es innerhalb der erythroiden Fraktion noch einmal separat analysiert. Die Analyse der erythroiden Kolonien könnte einen Aufschluss über eine eventuell erhöhte oder verringerte erythroide Differenzierung geben. Dabei bedeuten kleine Kolonien eine verringerte Proliferation und stärkere Differenzierung.



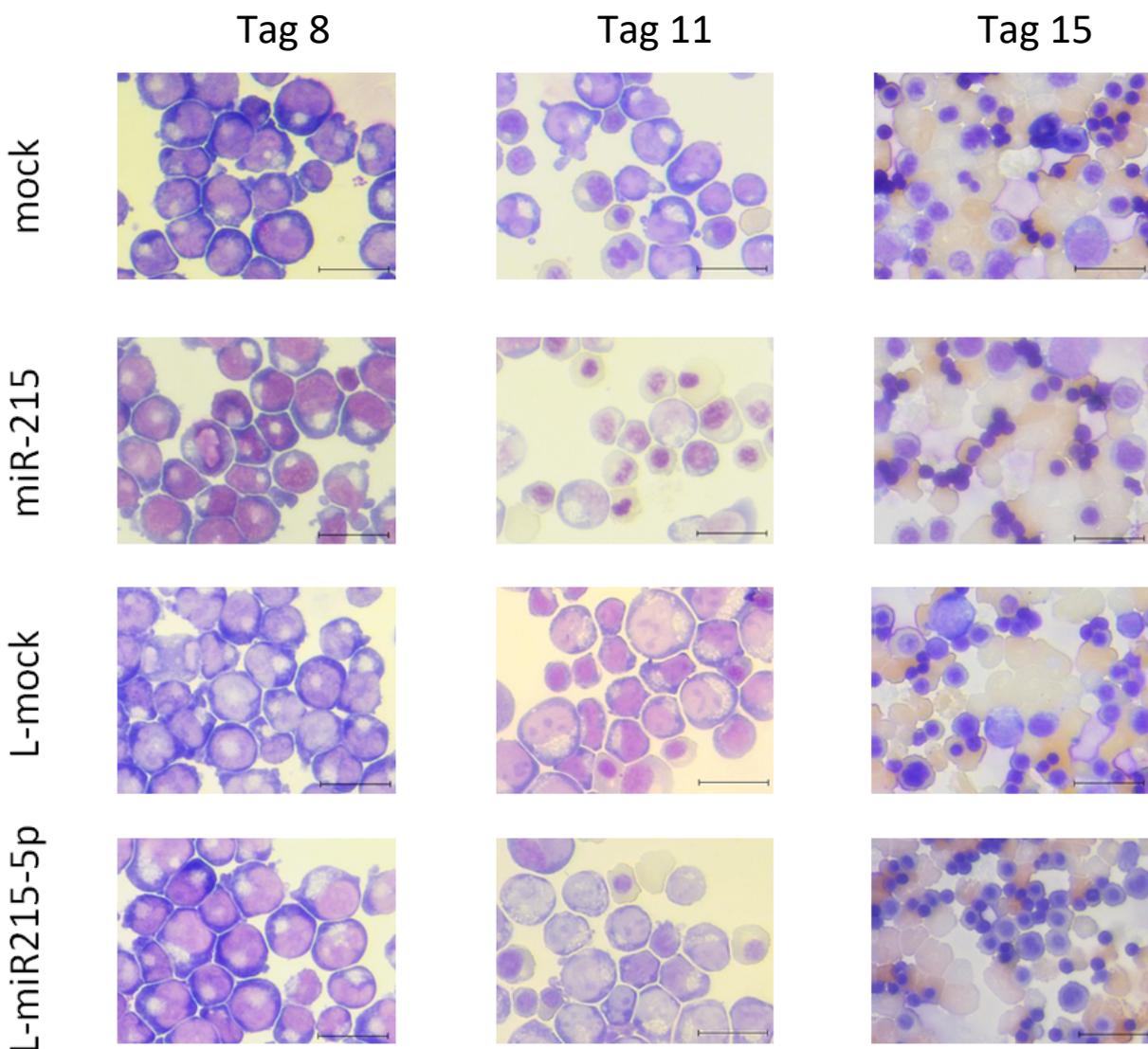
**Abbildung 4: Prozentualer Anteil von CFU-Es und BFU-Es an der erythroiden Gesamtkolonienanzahl**

Gezeigt wird der prozentuale Anteil von kleinen und großen erythroiden Kolonien an dem auf 100 % normierten Gesamtanteil der erythroiden Kolonien. Es wurden jeweils Triplikate pro Spender ausgewertet. N = 4 unabhängige Spender. Die statistische Auswertung erfolgte mittels student t- Test. Für die Standardbalken wurde der SEM-Wert verwendet und für einen p-Wert von < 0,05 wurde (\*) vergeben.

Unter der separaten Betrachtung der erythroiden Kolonien (Abb. 4) manifestierte sich der tendenziell signifikante Unterschied in der prozentualen Verteilung von CFU-Es und BFU-Es nach Überexpression der miR-215 im Vergleich zur mock-Kontrolle. Während der Anteil an BFU-Es in der mock-Probe  $46 \pm 5$  % beträgt, bilden hämatopoetische Stammzellen nach Transduktion der miR-215 nur  $32 \pm 8$  % große erythroide Kolonien. Aus dieser Datenanalyse geht hervor, dass die Überexpression der miR-215 in hämatopoetischen Stammzellen eine signifikante Verschiebung von BFU-Es zu CFU-Es bewirkt, welche mit einer erhöhten Differenzierung einhergeht. Die Analyse beider Locker-Proben ergab zwar graphisch eine geringe Erhöhung des Anteils an BFU-Es, allerdings hob diese sich unter Einbezug der

Standardabweichungen auf. Somit kann kein Einfluss auf die erythroide Differenzierung durch den Einsatz der endogenen miR-215-5p festgestellt werden.

Da in Abbildung 1 nach Überexpression der miR-215 eine tendenziell signifikante Hemmung der Proliferation mit fortschreitender Differenzierung festgestellt werden konnte, wurde als nächstes die Morphologie näher untersucht. Dabei lag das Hauptaugenmerk darauf, eine Erklärung, wie zum Beispiel (z.B.) eine beschleunigte Erythropoese, für den Effekt zu finden. Dazu wurde eine Zytozentrifugation durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die auf den Objektträgern befindlichen Zellen mit May-Grünwald/ Giemsa-Lösung angefärbt und anhand mikroskopischer Aufnahmen im Detail analysiert.



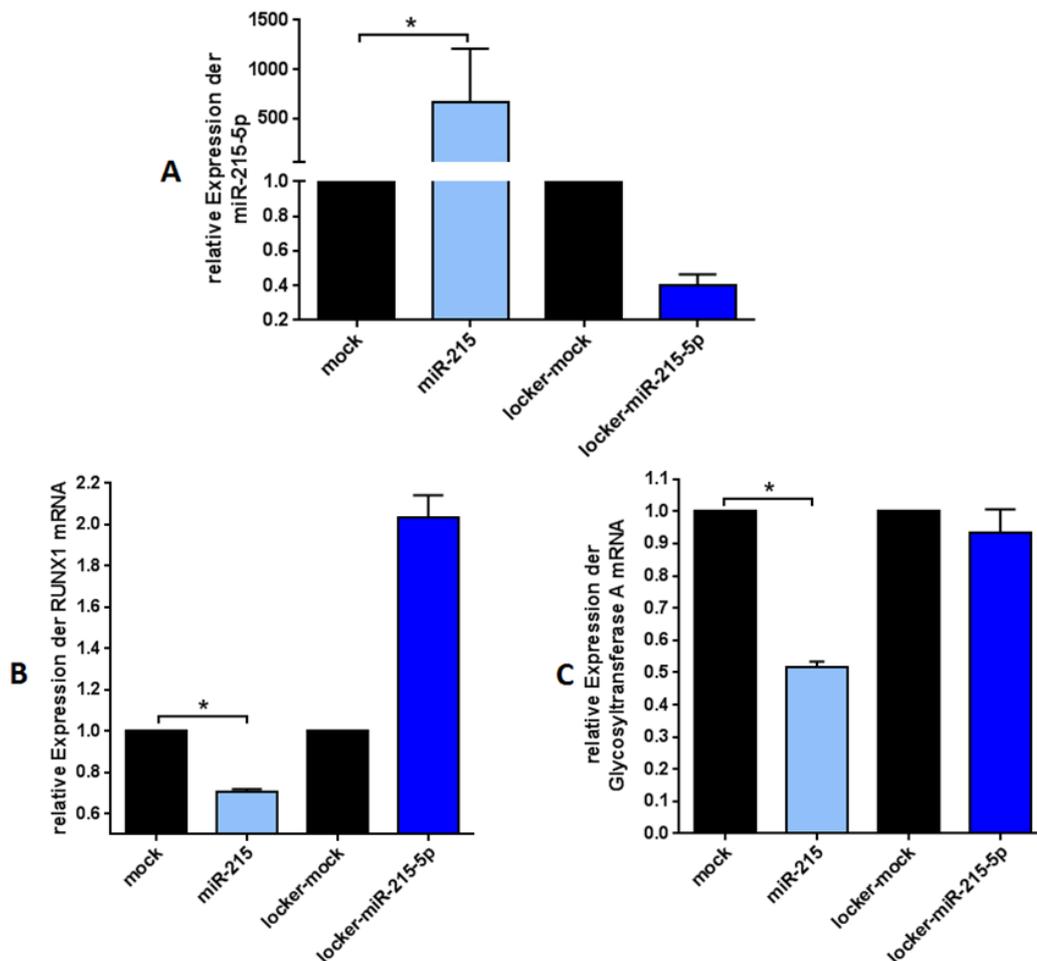
**Abbildung 5: Mikroskopische Analyse der Zelldifferenzierung im Verlauf der Erythropoese**

Dargestellt sind die mit May-Grünwald/Giesma-Lösung gefärbten Zytospins, aufgenommen mit einer 400-fachen Vergrößerung an unterschiedlichen Tagen der Differenzierung. Es ist eins von vier repräsentativen Experimenten gezeigt. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Die mikroskopischen Aufnahmen (Abb. 5) zeigten an Tag 8 nach der Transduktion mit der mock-Kontrolle vorwiegend Proerythroblasten, wohingegen sich nach Überexpression der miR-215 neben einigen Proerythroblasten auch schon Normoblasten und vereinzelt ausgeworfene Zellkerne erkennen lassen. Durch den Vergleich beider Locker-Plasmide können keine morphologischen Unterschiede festgestellt werden. Beide Proben kennzeichnen sich durch einen überwiegenden Anteil an Proerythroblasten. Am Tag 11 lassen sich schon deutlichere Unterschiede durch die Überexpression der miR-215 erkennen. Während die mock-Kontrolle immer noch einige Proerythroblasten, die durch Normoblasten und vereinzelt durch Retikulozyten ergänzt werden, aufwies, kam es nach Überexpression der miR-215 zu einer deutlichen Beschleunigung der Erythropoese. Die morphologische Auswertung ergab, dass sich keine Proerythroblasten mehr in der Probe befinden und die enthaltenen Normoblasten kurz vor dem Kernausswurf stehen. Des Weiteren lassen sich schon vereinzelt Retikulozyten erkennen. Nach Hemmung der endogenen miR-215-5p zeigten sich auch an Tag 11 der Differenzierung keine Unterschiede in der Morphologie. Der Effekt der beschleunigten Erythropoese durch Überexpression der miR-215 ist ab Tag 15 eindeutig nicht mehr zu sehen. Beide Proben, mock und miR-215, zeichnen sich neben vereinzelt azidophilen Normoblasten und toten Zellen, durch sehr viele Erythrozyten (rötliche Zellen) und Retikulozyten (gräuliche Zellen) aus. Auch das Verhältnis von Retikulozyten zu Erythrozyten scheint sich in der miR-215-Probe nicht von der mock-Kontrolle zu unterscheiden. Die mikroskopischen Aufnahmen der locker-mock und locker-miR-215-5p transduzierten Zellen weisen an Tag 15 ebenfalls überwiegend Erythrozyten und Retikulozyten, sowie vereinzelt azidophile Normoblasten und tote Zellen auf. Anhand der Morphologie-Analyse mittels mikroskopischer Aufnahmen konnte eine beschleunigte Erythropoese nach Überexpression der miR-215-5p innerhalb der ersten 11 Tage der Differenzierung festgestellt werden. Dahingegen hatte die Hemmung der endogenen miR-215-5p keine Auswirkung auf die Erythropoese. An allen drei Auswertungstagen konnte kein Einfluss auf die Differenzierung festgestellt werden.

## 4.2 Der Einfluss der miR-215-5p auf die Expression der Blutgruppe A

Neben den Untersuchungen zum Einfluss der microRNA auf die Proliferation und Differenzierung, wurde vor allem ihr Einfluss auf die Blutgruppenregulation näher betrachtet. Dabei wurde zunächst der Nachweis der Überexpression sowie der Hemmung der endogenen miR-215-5p erbracht (Abb. 6A). Parallel dazu wurde der Einfluss der Überexpression bzw. der Hemmung der miR-215-5p auf die mRNA von RUNX1 (Abb. 6B) und der Glycosyltransferase A (Abb. 6C) untersucht.

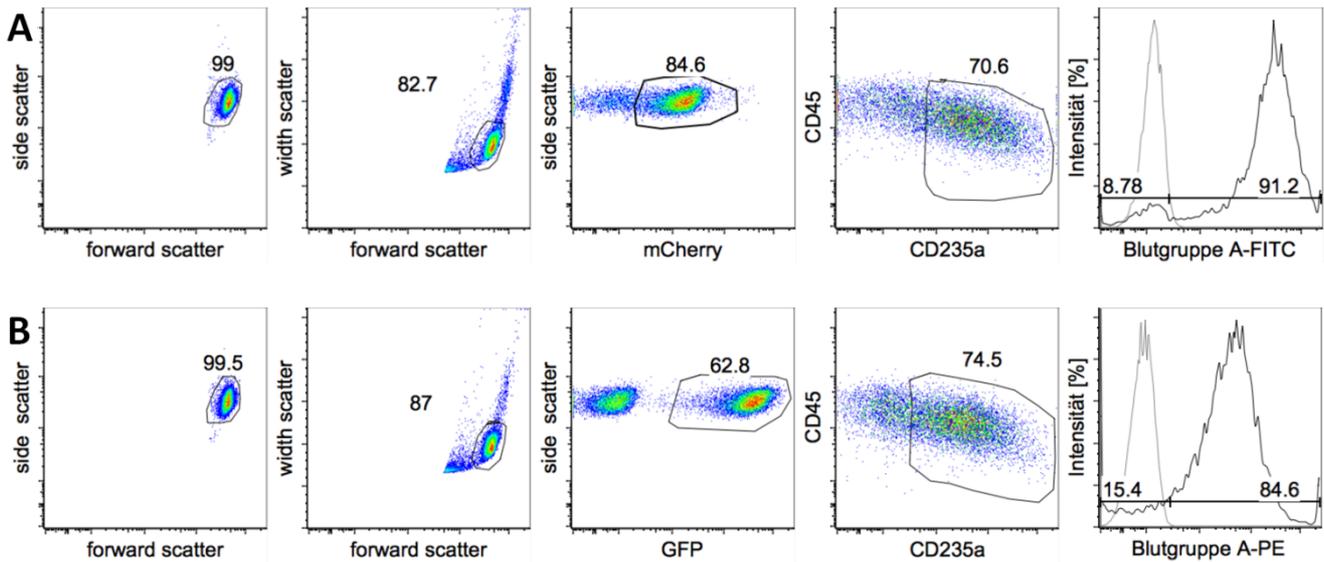


**Abbildung 6: Darstellung der relativen Expressionen**

Gezeigt werden die relative Expression der microRNA-215-5p (A), die relative Expression der RUNX1-mRNA (B), sowie der Glycosyltransferase-A-mRNA (C) bezogen auf die mock-Kontrolle. Dafür wurde an Tag 11 der Transduktion die RNA isoliert und anschließend mittels reverse Transkription umgeschrieben und qPCR analysiert. Die erhaltenen Daten der PCR-Analyse wurden für mock und miR-215 aus N=3 Versuchen; locker-mock und locker-miR-215-5p aus N=2 Experimenten mit unabhängigen Spendern erhalten und mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet. Für die Balken der Standardabweichung wurde der SEM-Wert verwendet. Für einen p-Wert von  $< 0,05$  wurde (\*) vergeben.

Aus der graphischen Darstellung der relativen Expressionen der miR-215-5p geht hervor, dass die Expression der miR-215 nach der Überexpression im Vergleich zur mock-Kontrolle um knapp das  $666 \pm 940$ -fache signifikant erhöht ist, dahingegen lässt sich durch den Einsatz des locker-Plasmids eine deutliche Hemmung der Expression um  $60 \pm 8 \%$  erkennen. Allerdings kann durch den Knockdown der endogenen miR-215-5p keine Signifikanz festgestellt werden, da erst  $N = 2$  Versuche durchgeführt wurden. Werden nun die relativen Expressionen der RUNX1-mRNA (Abb. 6 - B) betrachtet, so zeigt sich nach Überexpression der miR-215 eine statistisch signifikante Abnahme der mRNA-Expression um  $29 \pm 2 \%$ . Dahingegen führte der Knockdown der endogenen microRNA zu einer deutlichen Steigerung der RUNX1-mRNA-Expression. Zum Schluss wurden noch die mRNA-Level der Glycosyltransferase A (Abb. 6 - C) untersucht. Dabei ergaben sich deutliche Unterschiede zu den erhaltenen Ergebnissen der shRNA-Versuche (Anhang A). So führt die Überexpression der miR-215 zu einer Hemmung der Glycosyltransferase A-mRNA-Expression um fast die Hälfte ( $48 \pm 3 \%$ ), mit einhergehender Signifikanz. Dahingegen hatte die Herabregulation der locker-miR-215-5p keinen weiteren Einfluss.

Neben dem Einfluss auf die mRNA-Expression der Glycosyltransferase A wurde auch untersucht, ob die miR-215-5p Effekte auf die Blutgruppenantigenexpression ausübt. Dazu wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Für die Analyse wurden  $CD34^+$ -hämatopoetische Stammzellen verwendet, die mit miR-215, mock, locker-miR-215-5p und locker-mock an Tag 1 transduziert und *in vitro* zu Erythrozyten differenziert wurden. Die Arbeitsgruppe für experimentelle Transfusionsmedizin (TU Dresden) konnte bereits den optimalen Zeitpunkt für den Beginn der Blutgruppen-Expression ermitteln, welcher auch durch die Vorarbeit „Die Rolle des Transkriptionsfaktors RUNX1 bei der Regulation des Blutgruppe A-Antigens im Verlauf der Erythropoese“ (Schmidt, 2017) erneut bestätigt werden konnte. Aufgrund dieses Wissens wurden an den Analysetagen 8, 11 und 15 nach der Transduktion Untersuchungen zu einer veränderten Expression des Glycophorin-A (CD235a-APC), sowie der Blutgruppe A durchgeführt. Glycophorin A ist ein glycosylierendes Transmembranprotein der Erythrozyten und erythroiden Vorläuferzellen und kann mit Antikörpern gegen den erythroiden Marker CD235a-APC nachgewiesen werden.

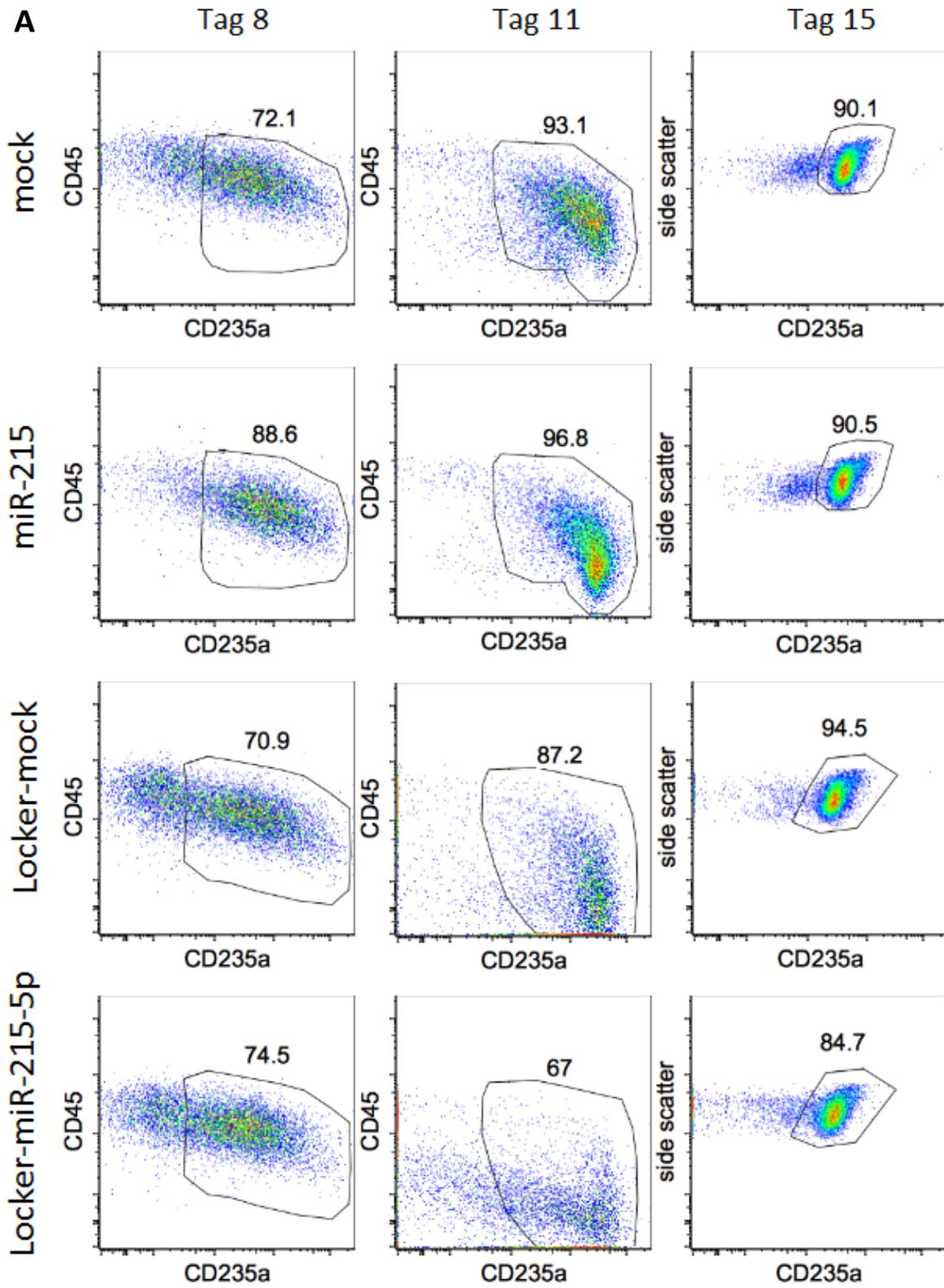


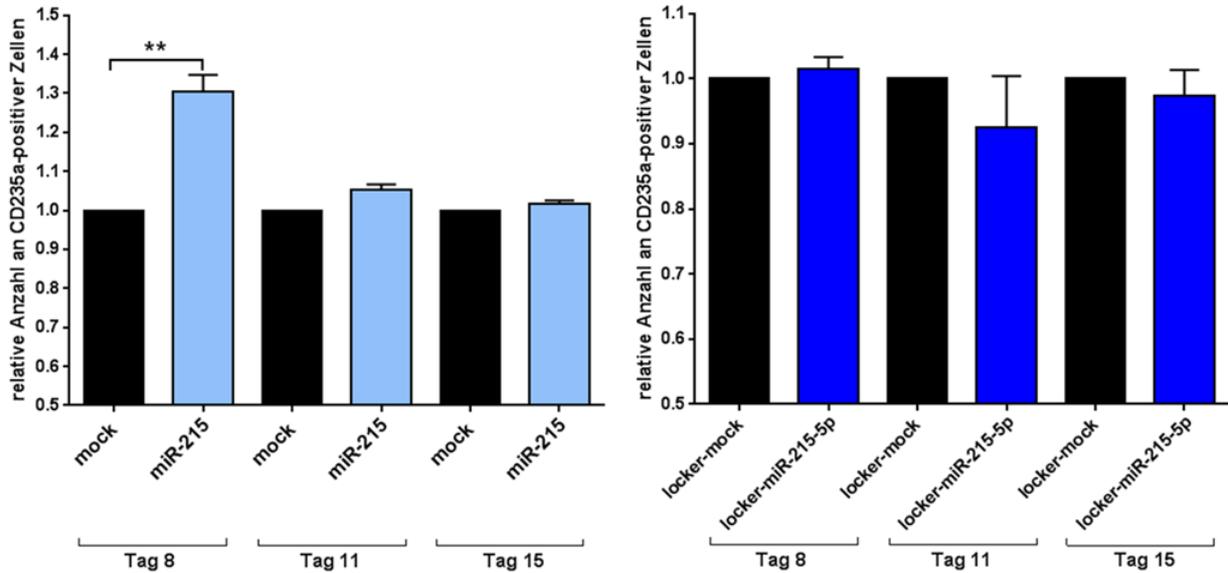
**Abbildung 7: Gating-Strategie der durchflusszytometrischen Analyse**

Die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich jeweils auf den Anteil an der Zellpopulation des vorhergehenden Gates.

Gezeigt werden die Gating-Strategie der mock- und miR-215-Probe über das im Vektor enthaltene Fluoreszenzgen mCherry (A) und die Gating-Strategie der Locker-mock- und Locker-miR-215-5p Probe über das im Vektor enthaltene Fluoreszenzgen GFP (B).

Die durchflusszytometrische Analyse der hämatopoetischen Stammzellen erfolgte nach einer festgelegten Gating-Strategie innerhalb logarithmisch dargestellter Dotplot-Diagramme (Abb. 7). Durch das Setzen von Gates in der durchflusszytometrischen Analyse konnte die Genauigkeit der Ergebnisse, aufgrund des Ausgrenzens von Zellen, die nicht der zu analysierenden Population angehörten, erhöht werden. Für die Proben mock und miR-215 (A), die in ihrem Vektor das Fluoreszenzgen mCherry enthielten, wurde das erste Gate zur Unterscheidung der Zellen nach Größe und Granularität gesetzt. Dabei wurden Zellen, die sich von der Hauptpopulation abtrennten durch das gesetzte Gate entfernt. Dabei war davon auszugehen, dass es sich bei diesen Zellen um bereits tote Zellen oder Zelltrümmer handelte. Als Nächstes wurde aus diesem gesetzten Gate der nächste Dotplot erstellt. Mit Hilfe des Forward- und Width-Scatters wurden Dubletten und Klumpen ausgeschlossen. Aufgrund der Möglichkeit mit Hilfe des Width-Scatters Partikelformen vorhersagen zu können, konnten in weiteren Analyseschritten die Einzelzellen betrachtet werden. Aus den Einzelzellen wiederum wurden jene heraus selektiert, welche keine mCherry- bzw. GFP-Fluoreszenz (B) aufwiesen und damit nicht erfolgreich transduziert wurden. Bevor es zu der Analyse der Blutgruppe A-Antigene mit Hilfe von FITC- (A) bzw. PE- gelabelten Antikörpern (B) in der Histogramm-Darstellung kam, erfolgte die Analyse der erythroiden Zellen. Dazu wurde der Anteil an Glycophorin A (CD235a-APC) und CD45-V450 innerhalb der GFP-, bzw. mCherry-positiven Fraktion betrachtet. Dies diente der Unterscheidung von erythroiden und frühen Vorläufer-Zellen (Abb. 8).



**B**

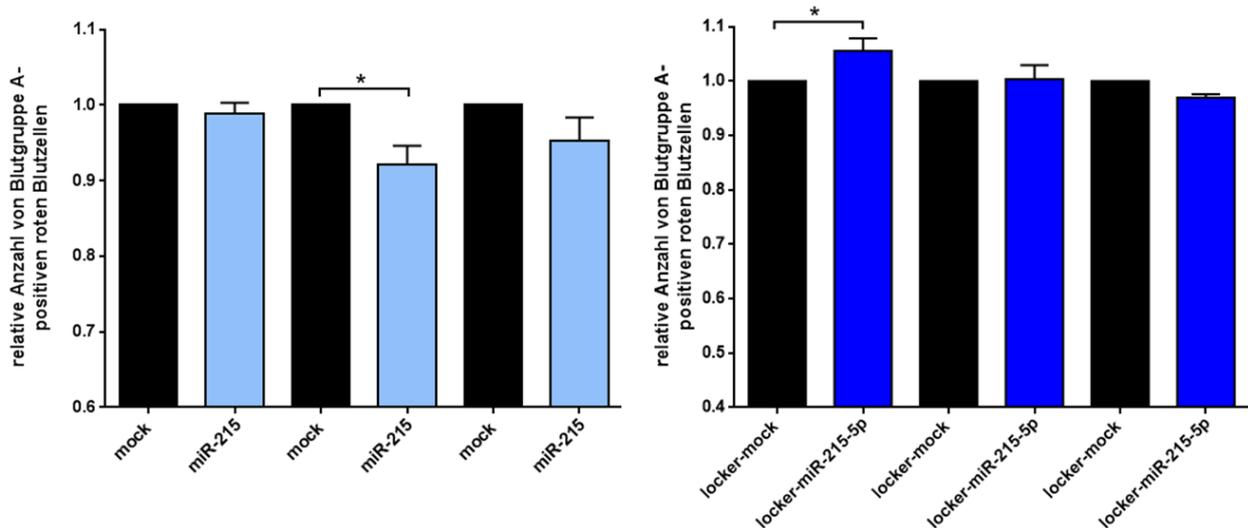
**Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analyse von CD235a-positiven Zellen im Verlauf der Erythropoese, N = 3**

Gezeigt werden die Dotplots der durchflusszytometrischen Analyse in logarithmischer Darstellung eines repräsentativen Beispiels (A). Die Zellen wurden sowohl mit Antikörpern gegen den erythroiden Marker CD235a-APC, als auch gegen den Leukozytenmarker CD45-V450 gefärbt. Anschließend erfolgte an Tag 8 und Tag 11 die Ermittlung des Anteils an CD235a-positiven Zellen innerhalb der GFP- bzw. mCherry- positiven Zellpopulation. Der Anteil an CD45-V450-positiven Zellen nimmt im Verlauf der Erythropoese immer weiter ab, weswegen an Tag 15 mithilfe des Seitwärtsstreulichts (Side Scatter) gated wurde. Außerdem sind die relativen Anzahlen an CD235a-positiven (erythroiden) Zellen der untersuchten transduzierten Proben (B) bezogen auf die mock-Kontrollen, sowie der SEM-Wert und die statistische Signifikanz graphisch dargestellt. Für eine hohe statistische Signifikanz bei  $p < 0,01$  wurden (\*\*) vergeben.

Für die durchflusszytometrische Analyse (Abb. 8 - A) wurde an den Tagen 8 und 11 der Differenzierung neben Glycophorin A, der Antikörper CD45-V450 eingesetzt, welcher ein Leukozytenmarker ist. Anhand der Dotplots verdeutlicht sich, dass an Tag 8 noch einige CD45-positive Zellen innerhalb aller Proben vorhanden sind. Erfolgt der Vergleich der mock- und miR-215-transduzierten Proben, lässt sich ein deutlicher Unterschied innerhalb des gesetzten Gates feststellen. Durch die Überexpression der miR-215 befinden sich an Tag 8 bereits mehr CD235a-positive Zellen innerhalb der GFP-positiven Fraktion, als die mock-Kontrolle aufweisen kann. Innerhalb der beiden Locker-Proben zeigt sich allerdings kein Unterschied in den Glycophorin A- positiven Zellpopulationen. Wird nun Tag 11 analysiert, so zeigen die Dotplots, dass der Großteil der transduzierten Zellen bereits CD45-negativ ist. Auch beide Locker-Proben weisen an Tag 11 nach der Transduktion wesentlich mehr CD45-negative Zellen als an Tag 8 auf. Da an Tag 15 nahezu alle Zellen CD45-negativ sind, wurde anstatt des Leukozytenmarkers, anhand der Granularität gated. Dabei zeigten sich am letzten Auswertungstag (Tag 15) keine Unterschiede im Anteil an CD235a-positiven Zellen zwischen der mock- und die miR-215 über-

exprimierten Probe. Auch die Dotplots der locker-miR-215-5p und ihrer Kontrollprobe zeigten ähnliches. Im Anschluss erfolgte die quantitative Analyse der relativen Veränderung an CD235a-positiven (erythroiden) Zellen der untersuchten transduzierten Proben (Abb. 8 – B). Diese sollte genauere Informationen über eine statistische Signifikanz liefern. Aufgrund der auftretenden Spendervarianz wurden die erhaltenen Werte der mock- und Locker-mock-Kontrollen auf 1.0 normiert. Bereits an Tag 8 der Differenzierung kann auch anhand der graphischen Darstellung ein deutlicher Unterschied zwischen der mock-Kontrolle und der microRNA-215 herauskristallisiert werden. Durch die Überexpression der miR-215 wurde die relative Anzahl an erythroiden Zellen um  $30 \pm 7 \%$  gesteigert. Allerdings kann dieser deutliche Effekt auch anhand dieser Darstellung an Tag 11 und Tag 15 in den Zellen, die mit miR-215 transduziert wurden, nicht mehr festgestellt werden. Somit führte die Überexpression der miR-215 an Tag 8 nach der Transduktion zur Steigerung der relativen Anzahl an erythroiden Zellen mit hoher statistischer Signifikanz, welche sich im Verlauf der Differenzierung wieder auf den Normalwert angleicht. Werden im Anschluss die locker-Plasmide betrachtet, so fällt auf, dass sich an Tag 8 auch anhand der relativen Anzahlen erythroider Zellen kein Effekt durch die Herunterregulierung der endogenen miR-215-5p erkennen lässt. Auch an den Tagen 11 und 15 können keine Effekte festgestellt werden. Mit Hilfe der quantitativen Analyse konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der endogenen miR-215-5p keinen Einfluss auf die Anzahl an erythroiden Zellen im Verlauf der Erythropoese ausübt.

Als nächstes wurden die relativen Anzahlen an BG A-positiven Zellen ermittelt (Abb. 9) und analysiert. Dies sollte dabei helfen, eine Aussage zur Regulierung der BG A-Expression treffen zu können. Die Auswertung wurde mit normierten Werten durchgeführt, um die auftretende Spendervarianz auszugleichen.

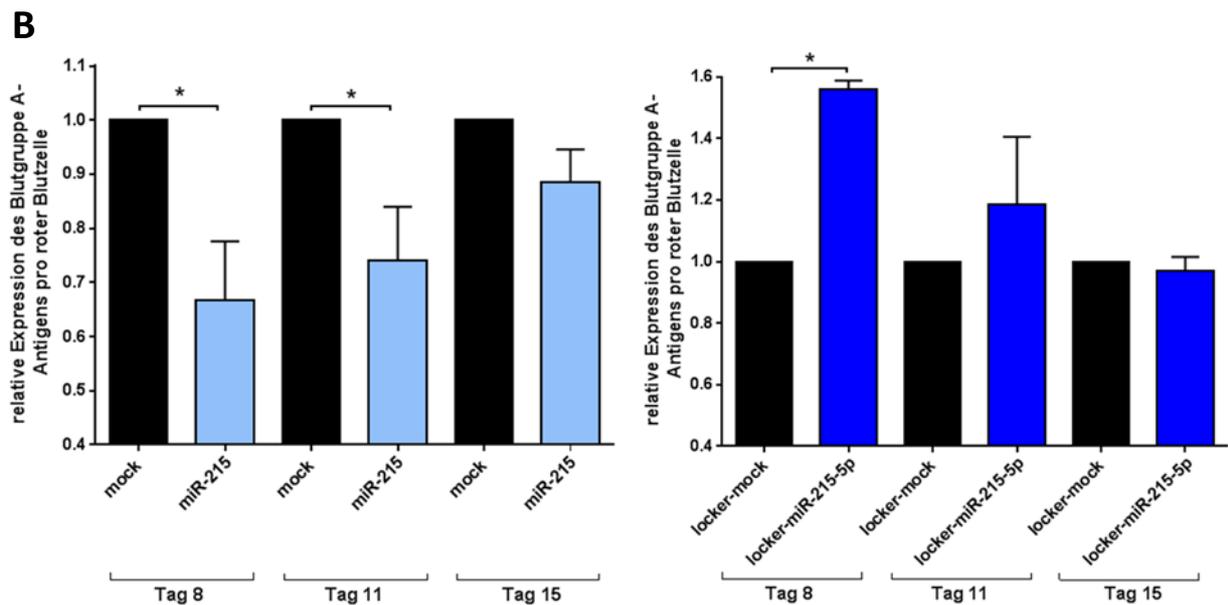
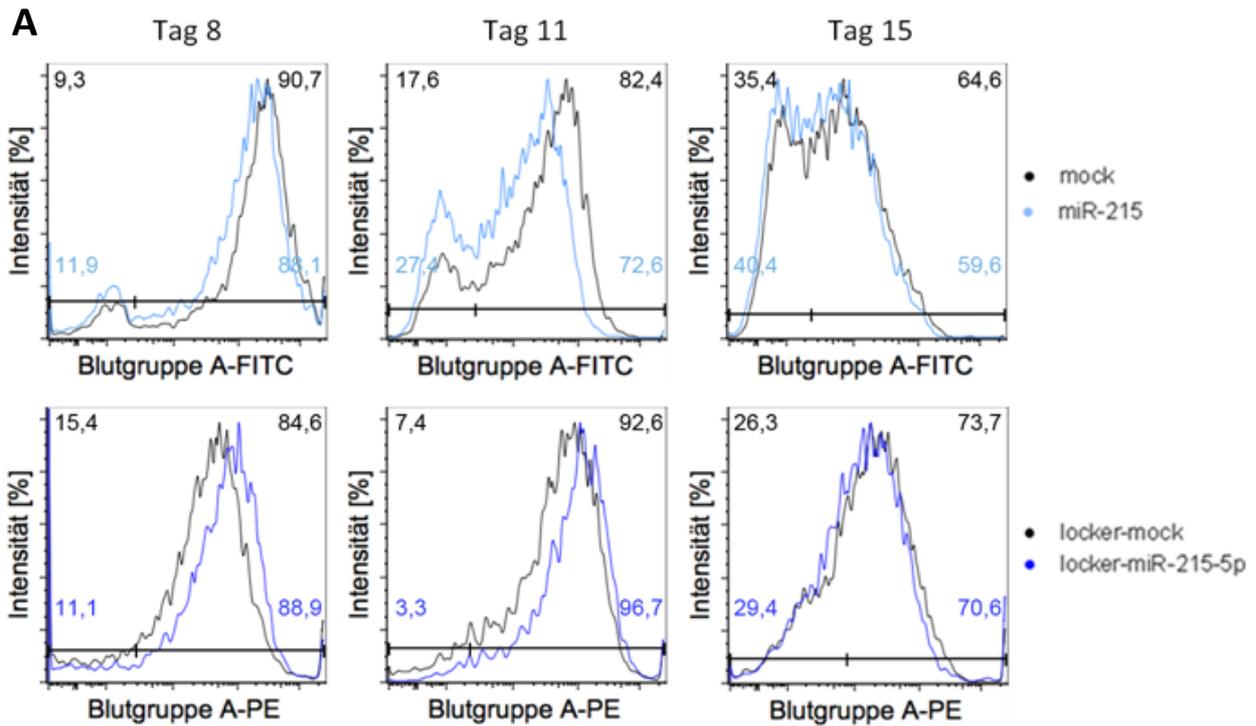


**Abbildung 9: Blutgruppe A-positive erythroide Zellen**

Die graphische Darstellung zeigt die relative Anzahl an BG A-positiven erythroiden Zellen nach Überexpression der miR-215 bzw. Herunterregulation der endogenen miR-215-5p (locker-miR-215-5p) bezogen auf ihre jeweiligen mock-Kontrollen. Desweiteren wurde die Standardabweichung der ermittelten Mittelwerte aus N=3 Versuchen, sowie statistische Signifikanzen gekennzeichnet. Für einen p-Wert von < 0,05 wurde (\*) vergeben.

Die quantitative Auswertung an Tag 8 der Differenzierung hat ergeben, dass es nach der Transduktion der miR-215 zu keinem Einfluss auf die relative Anzahl Blutgruppe A-positiver erythroider Zellen in Bezug auf die Kontrollprobe (mock) kam. An Tag 11 konnte eine signifikante Hemmung von  $8 \pm 4$  % durch die Überexpression der miR-215 verzeichnet werden. Dieser Effekt wurde allerdings an Tag 15 wieder aufgehoben. Es konnte festgestellt werden, dass die Überexpression der microRNA-215 einen Einfluss auf die relative Anzahl an Blutgruppe A-positiven erythroiden Zellen ausübt. Nach Herunterregulation der endogenen miR-215-5p war an Tag 8 ein signifikant erhöhter Anteil  $6 \pm 4$  % an BG A-positiven erythroiden Zellen zu erkennen. Sowohl an Tag 11 als auch Tag 15 der Differenzierung konnten dagegen keine statistisch signifikanten Veränderungen der relativen BG A-positiven Zellzahlen im Vergleich zur locker-mock-Kontrolle festgestellt werden.

Im Anschluss daran wurden Histogramme erstellt und zur durchflusszytometrischen Analyse der Effekte hinzugezogen. Mit Hilfe derer sollten Veränderungen innerhalb der Anzahl an BG A-Antigenen pro erythroider Blutzelle festgestellt werden (Abb. 10).



**Abbildung 10: Darstellung der Expression des BG A-Antigens pro erythroider Zelle**

Dargestellt ist die Fluorochrom-abgeleitete Fluoreszenzintensität auf einer logarithmischen Skala bezogen auf den Proben-spezifischen Antikörper(A). Die Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse zeigen einen Versuch, welcher repräsentativ für N = 3 Experimente steht. Des Weiteren sind die prozentualen Fluoreszenzintensitäten in den Ecken der Histogramme dargestellt. Des Weiteren wird die Quantitative Analyse der BG A-Expression pro erythroider Zelle dargestellt (B). Es wurden die Standardfehler der ermittelten Mittelwerte (SEM) und auftretende statistische Signifikanzen gekennzeichnet. Für eine statistisch hohe Signifikanz bei  $p < 0,05$  wurde (\*) vergeben.

Die aus der durchflusszytometrischen Analyse erhaltenen Histogramme (Abb. 10 – A) zeigten eine Gauß'sche Verteilung der Zellpopulationen. Die dargestellten Fluoreszenzintensitäten beziehen sich dabei auf die Anzahl an Blutgruppe A-Antigen-Bindungsstellen an der Zelle. Somit konnten Informationen über die Anzahl an BG A-Antigenen pro erythroider Blutzelle erhalten werden. An Tag 8 der Differenzierung konnte in den Histogrammen der mock und miR-215 die Ausbildung von zwei Peaks verzeichnet werden. Der größere, rechte Peak steht dabei für die BG A-positive Zellfraktion, während der kleinere linke Peak die BG A-negativen Zellen repräsentiert. Die Stärke der Fluoreszenz (Fluoreszenzintensität) korrespondiert zudem mit der Menge an BG A-Antigen pro erythroider Zelle. Dies bedeutet, je weiter rechts der Peak liegt, desto mehr BG A-Antigene befinden sich auf der Oberfläche pro Zelle. Nach Überexpression der miR-215 zeigt sich neben einer Erhöhung des BG A-negativen Peaks auch eine deutliche Linksverschiebung des BG A-positiven Peaks, was darauf hindeutet, dass sich weniger A-Antigene auf der Oberfläche der Zellen im Vergleich zur mock-transduzierten Probe befinden. Wird nun die quantitative Analyse vergleichend hinzu gezogen, so zeigt sich auch hier, dass die relative Expression des Blutgruppe A-Antigens pro erythroider Zelle durch die Überexpression der miR-215 im Vergleich zur mock-Probe statistisch signifikant um  $33 \pm 19 \%$  verringert wird. Noch deutlichere und aussagekräftigere Ergebnisse lieferte der 11. Kultivierungstag. Anhand der Histogramme (A) der mock- und miR-215-Proben ist eine deutliche Erhöhung des Negativ-Peaks und somit eine Zunahme an BG A-negativen Zellen nach Überexpression der miR-215 zu verzeichnen. Außerdem kann eine sichtbare Abnahme der Fluoreszenzintensität, Linksverschiebung der BG A-positiven Fraktion, festgestellt werden. Anhand der Quantifizierung (B) kann dies bestätigt und wie auch an Tag 8 eine statistisch signifikante Hemmung der A-Antigen-Expression von  $26 \pm 17 \%$  durch Überexpression der miR-215 verzeichnet werden. Am letzten Auswertungstag lässt sich erneut anhand der Histogramme und quantitativen Analyse eine Verringerung der relativen Expression der BG A-Antigene pro Zelle feststellen. Anhand dessen konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der miR-215 eine sichtbare Minderung der Antigen-Expression der Blutgruppe A im Verlauf der Erythropoese bewirkt. Aus den Histogrammen und Grafiken beider locker-Plasmide ließ sich ein kontroverser Effekt zur Überexpression der miR-215 feststellen. Bereits an Tag 8 lässt sich, verglichen mit der locker-mock-Probe, eine deutliche Rechtsverschiebung der BG A-positiven, erythroiden Zellpopulation anhand der Histogramme erkennen, woraus eine erhöhte BG A-Antigenexpression auf der Oberfläche der Zellen hervorgeht. Außerdem kann anhand des vorhandenen BG A-positiven Peaks festgestellt werden, dass ein Großteil der Zellen BG A-positiv sind. Wird nun noch die Quantifizierung vorgenommen, so kann auch anhand der Grafik (B) eine Steigerung der BG A-Antigenexpression mit hoher statistischer Signifikanz erkannt werden. Diese Expressionssteigerung beträgt nach Transduktion der locker-miR-215-5p an Tag 8  $56 \pm 5 \%$ . An Tag 11 kann dieser Effekt, jedoch nicht so stark ausgeprägt, ebenfalls beobachtet werden. Es lassen sich sowohl anhand

des repräsentativen Beispiels im Histogramm (A), als auch anhand der quantitativen Auswertung (B) eine Expressionssteigerung des A-Antigens durch die Hemmung der miR-215-5p verzeichnen, die allerdings mit einer hohen Standardabweichung einhergeht. An Tag 15 nach der Transduktion kann kein Effekt durch die Herunterregulation der endogenen miR-215-5p festgestellt werden. Somit zeigte sich, dass die Hemmung der endogenen miR-215-5p in hämatopoetischen Stammzellen eine beschleunigte Expression der BG A-Antigene innerhalb der ersten 11 Tage der Erythropoese zeigte.

## 5. Diskussion

Das humane ABO Blutgruppen-System, wurde durch Karl Landsteiner (Landsteiner, 1900) entdeckt, als er den Versuch unternahm die Zellbestandteile von den flüssigen Bestandteilen des Blutes zu trennen und es durch das Mischen verschiedener Blutproben zur Agglutination der Erythrozyten kam (Yamamoto, 2004). Dabei war und ist die Entdeckung des ABO-Systems besonders in der Transfusions- und Transplantationsmedizin von entscheidender Bedeutung. Das Wissen über das ABO-System in den Bereichen der Kohlenhydratchemie, Enzymologie, Genetik oder Evolutionsbiologie gewann nicht nur in den über 100 Jahren Forschung weiter an Komplexität, sondern dient täglich als Grundlage für die Arbeit in Laboren und Kliniken (Storry, 2009). Trotz der langen Forschungsarbeit auf diesem Gebiet, konnte vor allem die Regulation der Blutgruppen-Antigene noch nicht vollständig geklärt werden. Zwar wurden bereits einige Ursachen für Veränderungen der A- und B-Antigen-Expression identifiziert, die z.B. durch Mutationen in der Genstruktur, Modifikationen der Transferase mRNA während der Transkription, posttranskriptionell oder der Translation, oder durch Enzym-Translokationen im Golgi-Apparat verursacht werden (Yamamoto, 2004). Dennoch bleibt die Ursache einer veränderten ABO-Expression in einigen Fällen noch ungeklärt. Dazu zählen nicht nur eine veränderte Expression in der Schwangerschaft (Thuresson, 2008), bei Neugeborenen oder in verschiedenen Stadien der menschlichen Entwicklung (Yamamoto, 2004), sondern auch in zahlreichen pathologischen Prozessen, wie zum Beispiel der Tumorgenese (Kominato, 2005). Neben den bereits bekannten Ursachen für eine veränderte Antigen-Expression der ABO-Blutgruppen, wurden auch einige regulatorische Elemente in der DNA-Sequenz der Glycosyltransferase gefunden, die an der Regulation beteiligt sind. Darunter befindet sich ein ubiquitärer proximaler Promotor in der Cytosinphosphatidyl-Guanin (CpG)-reichen Region oberhalb des Startcodons (Hata, 2001) und ein Zelltypspezifischer Promotor am 5' Ende der CpG-reichen Region, welcher sich 3,8 kb außerhalb des Exon 1 befindet (Sano, 2012). Außerdem konnten weitere negativ regulatorische Elemente in der 3' Region, 2,2 kb unterhalb des ABO-Gens identifiziert werden (Sano, 2011). Dabei sind es nicht nur regulatorische Elemente, wie Promotoren, Enhancer und Silencer, die an der Regulation der Glycosyltransferase beteiligt sind. Eine Beteiligung an diesem Regulationsmechanismus konnte auch schon für eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren (TF) nachgewiesen werden, deren Bindungsstellen sich vor allem innerhalb der CpG-Islands des proximalen Promotors befinden. Allerdings wurde auch eine außerhalb des proximalen Promotors liegende TF-Bindungsstelle identifiziert. Diese TF-Bindungsstelle für den TF RUNX1, welche sich im Intron 1 befindet, wurde im Jahr 2014 identifiziert und wird bei Individuen mit der Blutgruppe A<sub>m</sub> bzw. B<sub>m</sub> aufgrund einer Mutation gelöscht. Es wurde außerdem vermutet, dass mit dieser Mutation eine Hemmung der Transkription im A- und B-Allel, sowie die Hemmung der spezifischen Antigen-Expression einhergeht (Takahashi, 2014; Sano, 2015). Erst Mitte dieses Jahres wurden Daten zur Rolle des Transkriptionsfaktors RUNX1 bei der Regulation des Blutgruppe A-

Antigens veröffentlicht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Hemmung von RUNX1 durch shRNAs zu einer verringerten Anzahl an BG A-positiven Zellen führte und die Anzahl an Blutgruppe A-Antigenen pro Zelle signifikant verringert werden konnte (Schmidt, 2017).

Bereits seit dem Jahr 2009 ist bekannt, dass miRNAs ebenfalls eine Schlüsselrolle in der Regulation fast aller wichtigen zellulären Prozesse, einschließlich der Differenzierung, Apoptose, Zellproliferation, onkogener Transformation und bei der Organentwicklung spielen (Bartel, 2009). Seither wurden zu den über 1900 miRNA-Sequenzen, die seit dem Jahr 2011 bekannt sind (Kozomara, 2011), 3707 neue miRNA-Sequenzen durch Forscher der Thomas Jefferson Universität identifiziert, die innerhalb des menschlichen Genoms codiert werden (GEN, 2015). MiRNAs sind kleine, endogene Einzelstrang-RNA Moleküle, welche die Regulation der posttranskriptionellen Genexpression entweder durch Hemmung der Translation oder durch Destabilisierung des Target-Transkripts bewirken (Bruchova, 2007). Kronstein-Wiedemann et al. konnte bereits mehrfach Daten zur Rolle der miRNAs, insbesondere der miR-331-3p und miR-1908-5p, bei der Regulation der Glycosyltransferase A- und B-Expression publizieren. Dabei konnte die Glykosyltransferase A- und B-mRNA als direktes Target beider miRNAs identifiziert werden (Schrezenmeier, 2014; Kronstein-Wiedemann, 2016). Des Weiteren konnte herausgefunden werden, dass, aufgrund der Hemmung des TFs SP1 durch die miR-331-3p, der Transkriptionsfaktor nicht mehr in der Lage war, an den Promotor des ABO-Gens zu binden, wodurch wiederum die Blutgruppe-A-Antigenexpression herunterreguliert wurde (Kronstein-Wiedemann, 2016). Aufgrund seiner regulierenden Funktion während der Blutgruppe A-Antigen-Expression im Verlauf der Erythropoese hämatopoetischer Stammzellen (Schmidt, 2017), wurde RUNX1 in Kombination mit einer miRNA, die in Zellen der BG O gegenüber AA stärker exprimiert wird und an RUNX1 direkt bindet, näher untersucht. Dafür konnte die miR-215-5p identifiziert werden, welche im 5' Arm der pre-miR-215 enthalten ist. Um eine direkte funktionelle Beteiligung der miR-215-5p an der Antigen-Expression feststellen zu können, wurde die pre-miR-215 in CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen mit Hilfe eines lentiviralen Vektorsystems (Anhang C) überexprimiert. Zusätzlich erfolgte eine Verifizierung der erhaltenen Daten durch die Verwendung eines Locker-miR-Plasmids, wodurch die endogene miR-215-5p durch den Einsatz einer komplementären anti-miRNA ausgeschaltet wurde. Anhand der Ergebnisse zum Einfluss der miR-215-5p konnte festgestellt werden, dass die Überexpression der miR-215 zu einer Verringerung der BG A-Antigenexpression führte und die Hemmung der endogenen microRNA eine beschleunigte Expression der Blutgruppe A innerhalb der ersten 11 Tage bewirkte. Jedoch ließen sich an Tag 15 keine Veränderungen in der BG A-Expression im Vergleich zur locker-mock-Kontrolle feststellen, welches sich dadurch begründet, dass die Blutgruppe A-Expression auch unter normalen Bedingungen zu diesem Zeitpunkt bereits abgeschlossen ist. Somit ist keine weitere Steigerung der A-Antigene auf der Oberfläche der Zellen möglich.

Zudem konnten weitere Veränderungen während der Erythropoese festgestellt werden. Aus der durchflusszytometrischen Analyse ging eine Abnahme der mCherry-positiven Zellen im Verlauf der erythroiden Differenzierung hervor, wohingegen die Anzahl der GFP-positiven Zellen unverändert blieb (Anhang H).

Eine Möglichkeit, warum es im Verlauf der Erythropoese nach Überexpression der pre-miR-215 zu einem Silencing des mCherry kommt, wäre, dass es aufgrund der Biosynthese der microRNAs zu einem Silencing des Vektors kommt. Während ihrer Synthese wird das miRNA-Gen, welches ein Produkt aus der RNA-Polymerase-II-Aktivität und unabhängiger Transkriptionseinheiten ist, zur pri-miRNA transkribiert (Lee, 2004). Anschließend wird die pri-miRNA im Zellkern durch einen Mikroprozessor-Komplex zu einem pre-miRNA-Stemloop katalysiert (Yi, et al., 2003). An dieser Stelle der Synthese wird der Vektor der pre-miR-215, welcher das mCherry-fusionierte Puromycin-Resistenzgen enthält, in den Zellkern integriert. Nach mehreren Spaltprozessen und dem Transport ins Zytoplasma wird pre-miRNA mit Hilfe eines Dicers gespalten und in den RISC-Komplex aufgenommen. Im RISC-Komplex kann die reife miRNA anschließend die gewünschte mRNA herunterregulieren (Winter, 2009). Im Zuge der vielen Spaltprozesse der pre-miR-215 wird der Vektor vermutlich mit abgebaut, wodurch sich die Abnahme der Anzahl an mCherry-positiven Zellen erklären würde (Anhang H). Dahingegen lagert sich die anti-miRNA (locker-miR-215-5p) an die bereits reife miRNA an, die sich bereits im Zytoplasma befindet (Winter, 2009). Somit können Spaltprozesse keinen Einfluss auf den Vektor der anti-miRNA, mit dem enthaltenen GFP-fusionierten Blasticidin-Fluoreszenzgen, nehmen. Diese Aussage kann durch die durchflusszytometrische Datenanalyse gestützt werden, welche keine wesentlichen Veränderungen der Anzahl an GFP-positiven Zellen im Verlauf der Erythropoese ergab. Anti-miRNAs sind Oligonucleotide, die gezielt an reife microRNAs im Zytoplasma binden, wodurch die Bindung an die 3'UTR der Target-mRNA nicht mehr erfolgen kann (Sun, 2017). Daraus resultiert, dass die reife miRNA die Regulation der Target-mRNA-Expression nicht mehr regulieren kann (Stenvang, 2012).

Mit Hilfe der Daten, zur Wirkung der miR-215-5p auf die Expressionen der RUNX1- und Glycosyltransferase A-mRNA, konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der miR-215 eine Hemmung der RUNX1- und Glycosyltransferase A-mRNA-Expression bewirkte. In der Literatur wird ein Mechanismus beschrieben, welcher eine Erklärung für das Silencing von RUNX1 durch die Überexpression, aber auch für die Effekte durch die Inhibierung der endogenen miRNA, darstellen könnte.

In zahlreichen Publikationen wird eine Beteiligung der Chromatin-Struktur an der Regulation von genetischen Aktivitäten beschrieben (Barski, 2009; Nisha, 2008). Dabei befinden sich in den Bindungsstellen von regulatorischen Elementen, wie z.B. Promotoren, Enhancer, Silencer und Locus-Kontrollregionen (Pruitt, 2016), DNase-I-hypersensitive Stellen (DHS), welche eine sehr hohe Empfindlichkeit (100 – 1000 x empfindlicher als gewöhnliches Chromatin) gegenüber der Endonuclease

DNase I aufweisen. Diese hohe Empfindlichkeit wird durch die Übertragung von Acetylgruppen auf Histone, welche zu einer Auflockerung des Chromatins führen, und nachfolgende Strukturveränderung des Chromatins durch den Chromatin Remodeling Komplex (CRK) bewirkt. Innerhalb dieses Komplexes kommt es zu veränderten Wechselwirkungen zwischen der DNA und den Histonen, wodurch die nucleosomale Struktur verändert und die, im Chromatin enthaltene DNA für Transkriptionsfaktoren zugänglich gemacht wird (Knippers, 2001). Das Chromatin, welches durch miRNAs reorganisiert wird, wird vor allem für die Erhöhung der DNA-Methylierungen innerhalb der CpG-Islands verbunden (Barski, 2009; Deaton, 2011). Da die Cytosin-Bereiche der CpG-Islands nicht methyliert sind, kann durch Methylierung der Cytosine die Genexpression, beispielsweise des ABO-Gens, gehemmt werden (Kominato, 2002). RUNX1 wird von zwei Promotoren exprimiert: während der distale Promotor (P1) in hämatopoetischen Stammzellen vorherrscht, überwiegt der proximale Promotor (P2) in der Hämatopoese. Dabei konnten Webber et al. vor allem Veränderungen durch DNA-Methylierung innerhalb der P1-Region des RUNX1 während der hämatopoetischen Entwicklung feststellen (Webber, 2013). Die miR-215-5p kennzeichnet sich dadurch, dass sie den Transkriptionsfaktor RUNX1 als direktes Targetgen besitzt und an ihn binden kann (miRnalyze, 2017). Durch die Überexpression der pre-miRNA-215 kann eine starke Bindungsaffinität der miR-215-5p an RUNX1 erzeugt werden, wodurch im Zuge des natürlichen Syntheseweges die Herunterregulierung der RUNX1-mRNA erfolgen kann. Takahashi et al. lokalisierte die Bindungsstelle für den TF RUNX1 im Intron 1 der Glykosyltransferase (Takahashi, 2014), wodurch die miR-215 indirekt auch einen Einfluss auf die mRNA der Glykosyltransferase ausüben konnte. Die Hemmung der Glykosyltransferase mRNA durch die Überexpression der pre-miR stellt ein konträres Ergebnis zu den durchgeführten Experimenten mit shRNAs dar. Daraus ergab sich, dass die Hemmung von RUNX1 durch shRNAs eine deutliche Steigerung der Glykosyltransferase A-mRNA-Expression erzielte (Anhang A - Abb. 11 F). Die konträren Ergebnisse ergeben sich daraus, dass durch die Verwendung von shRNAs nur RUNX1 inhibiert wurde und kein Einfluss auf die Promotorregion der Glykosyltransferase, wodurch diese nicht reguliert werden konnte, ausgeübt wurde. Der Einsatz der miR-215-5p bewirkte jedoch nicht nur eine RUNX1-Inhibierung. Im Jahr 2016 konnte neben der Bindungsaffinität der endogenen miRNA zum TF RUNX1 auch eine Affinität zum TF YY1, der eine Bindungsstelle in der Promotorsequenz der Glykosyltransferase besitzt, festgestellt werden (Chen, 2016). Daraus ergibt sich, dass die Glykosyltransferase A-mRNA durch die Überexpression der miR-215 vermutlich nicht nur durch die Bindung an den TF RUNX1, sondern auch durch die zusätzliche Bindung an den TF YY1 verstärkt beeinflusst wurde. Diese Hypothese könnte mit Hilfe des Nachweises der YY1-mRNA-Level nach der Überexpression der miR-215 in weiterführenden Experimenten bestätigt werden.

Im Gegensatz zur Überexpression der pre-miR führte der Einsatz der anti-miRNA, welche die Hemmung der endogenen miR-215-5p bewirkte, zu einer deutlichen Steigerung der RUNX1-mRNA-

Expression. Das mRNA-Level der Glycosyltransferase blieb dahingegen unbeeinflusst. Die Hemmung der endogenen miR-215-5p kann ebenfalls durch den oben beschriebenen Mechanismus erklärt werden. Wie durch Sun et.al beschrieben wurde, kann die reife miR-215, durch die Bindung der anti-miRNA (Locker-miR-215-5p), nicht mehr an die Target-mRNA, also an die mRNA des RUNX1, binden. In Folge dessen kann, aufgrund von vermehrten DNA-Methylierungen (siehe oben) oder einer Dysfunktion der miR-215, keine Hemmung der RUNX1-mRNA-Expression erfolgen. Ergo, kann auch keine Regulation der mRNA der Glycosyltransferase vorgenommen werden, welches durch die erhaltenen Daten aus den Experimenten bestätigt werden kann.

Anhand der Daten, die innerhalb dieser Arbeit generiert wurden, konnten nicht nur Auswirkungen auf die Regulation der Blutgruppe A-Expression festgestellt werden. Die zusätzliche Analyse der hämatopoetischen Stammzellen, die mit der pre-miR-215 und der anti-miRNA (locker-miR-215-5p) transduziert wurden, in Bezug auf die Proliferation zeigten ebenfalls tendenzielle Effekte. Faltejskova-Vychytilova et al. konnte durch Untersuchungen zur miR-215-5p, welche als Tumorsuppressor und Onkogen fungieren kann, feststellen, dass die Überexpression der miRNA eine signifikante Verringerung der Proliferation bewirkte (Faltejskova-Vychytilova, 2017). Des Weiteren steht eine Überexpression der pre-miRNA nachweislich nicht nur ebenfalls im Zusammenhang mit der Hemmung der Proliferation, sondern auch mit der Verringerung des AKT1-Niveaus (Yao, 2017). AKT1 gehört neben den beiden anderen Isoformen des AKTs (AKT2, AKT3) dem Proteinkinase B (PKB)-Komplex an. Dieser stellt ein Teil der Signaltransduktion im Körper dar und übernimmt die Aufgabe der Phosphorylierung und Regulierung von Proteinen, die an dem Wachstum, der Proliferation und der Apoptose von Zellen beteiligt sind (Nicholson, 2002). Des Weiteren werden PKBs als Onkogene identifiziert, da sie in Tumorzellen häufig überaktiv agieren (Gerhardt, 2017). Somit könnte eine Verringerung der Proliferation durch die Überexpression der pre-miRNA sowohl mit einer Störung der Signaltransduktion inklusiver Hemmung des AKT1-Niveaus, als auch mit der Eigenschaft der miRNA als Tumorsuppressor zu wirken, zusammenhängen.

Neben den Veränderungen, die in der Proliferation der transduzierten hämatopoetischen Stammzellen festgestellt werden konnten, konnten auch innerhalb der Morphologie Unterschiede festgestellt werden. Dabei zeigte sich, dass die Überexpression der miR-215 innerhalb der ersten 11 Tage der Differenzierung eine Beschleunigung der Erythropoese bewirkte. Allerdings ging aus der morphologischen Analyse an Tag 15 hervor, dass der Effekt der beschleunigten erythroiden Differenzierung wieder aufgehoben wurde. Verschiedene wissenschaftliche Publikationen berichten darüber, dass die Expression des TFs RUNX1 während der erythroiden Differenzierung stetig sinkt (Sood, 2017; Nimmo, 2017), wobei Ichikawa et al. sogar zeigen konnte, dass RUNX1 in reifen erythroiden Zellen gar nicht mehr exprimiert wird (Ichikawa, 2012). Anhand der Literatur kann der fehlende Effekt an Tag 15 der Differenzierung durch die natürliche Inhibierung von RUNX1 erklärt werden.

Abschließend sollte noch ein wichtiger Punkt in Bezug auf die erhaltenen Ergebnisse betrachtet werden. Eine entscheidende Rolle dabei spielt die Verwendung von mobilisiertem Peripherblut der Blutgruppen O01/A101 und O02/A101 und die auftretende Spendervarianz, woraus teilweise enorme Standardabweichungen resultierten. Zur Verifizierung müssten dahingehend weiterer Experimente im großen Maßstab durchgeführt werden. Des Weiteren konnten anhand der Daten, die durch die CFU-Assay-Analyse generiert wurden, kontroverse Ergebnisse zu der Arbeitsgruppe von J. Lausen festgestellt werden, welche sich ebenfalls mit dem Transkriptionsfaktor RUNX1 auseinandersetzt (Herkt, 2017). Durch die Überexpression der miR-215-5p und die damit verbundene Hemmung von RUNX1-mRNA-Expression konnte ein erhöhter Anteil an myeloiden Kolonien festgestellt werden, wohingegen aus den Publikationen von Herkt et al. und Kuvardina et al. einer Repression der myeloiden Differenzierung durch RUNX1-Inhibierung hervorgeht. Als Grund dafür konnten Unterschiede innerhalb der Kultivierungsbedingungen identifiziert werden. Während die Arbeitsgruppe von Lausen die CD34<sup>+</sup>-hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) bis zum Sorten an Tag 6 in speziellem Serum-freien Stammzellmedium (vergleichbar mit dem Stammzelltransduktionsmedium, siehe 3.1.7) kultiviert, wurden die HSCs innerhalb dieser Experimente bereits an Tag 3 in Kultivierungsmedium aufgenommen, welches das Zytokin Erythropoetin (EPO) beinhaltet, und an Tag 4 gesortet. EPO stellt ein Stimulator für die Erythropoese dar, wodurch die hämatopoetischen Stammzellen innerhalb der 24 Stunden offensichtlich auf die erythroide Linie geprimed wurden und sich daraus die Unterschiede in den CFU-Assays ergaben. Durch Variation der Kultivierungsbedingungen, wie z.B. die Kultivierung der CD34<sup>+</sup>-hämatopoetischen Stammzellen in Serum-freiem Medium bis zum Sorting und den Verzicht von EPO, könnte zusätzlich überprüft werden, ob dieselben Resultate, wie in dieser Arbeit, erzielt werden.

Ein anderer interessanter Aspekt ist, dass eine weitere microRNA (miR-192-5p) identifiziert wurde, die in Zellen der BG O gegenüber AA mehr als doppelt so stark exprimiert wird (Kronstein-Wiedemann, submitted 2017) und sich in einem Cluster mit der miR-215-5p befindet. Innerhalb der Arbeitsgruppe werden dahingehend weiterführende Experimente zur Rolle der miR-192-5p separat und in Verbindung mit der miRNA-215-5p folgen. Dabei wird untersucht, ob sich der Effekt der miR-215-5p durch kombinierte Überexpression beider miRNAs verstärken lässt.

Darüber hinaus kann das Wissen über die Rolle von microRNAs und des Transkriptionsfaktors RUNX1 bei der Expression von Blutgruppenantigenen auf andere Blutgruppen (Rhesus, Kell, Duffy) ausgeweitet werden und die Tür für therapeutische Interventionen bei Erkrankungen öffnen, in denen Blutgruppen-Antigene die Pathologie der Krankheit fördern.

## 6. Ausblick

Erstmals wurde eine Veränderung der ABO-Expression bei hämatologischen Krankheiten im Jahr 1957 beobachtet (van Loghem Jr., 1957). Doch auch nach 60 Jahren Forschung konnte bislang noch keine Ursache für ein verändertes Expressionsverhalten gefunden werden. Allerdings werden jeden Tag neue, Tumor-regulierende Elemente identifiziert. Auch der Transkriptionsfaktor RUNX1 und die miRNA-215-5p stellen zwei dieser Elemente dar. Beide kennzeichnen sich durch ihre widersprüchliche Eigenschaft, als Tumorsuppressor und Onkogen wirken zu können (Yao, 2017; Sood, 2017). So konnte die miRNA bereits bei Haut-, Bauchspeicheldrüsen-, Lungen-, Dickdarm- und Brustkrebs, sowie akuter myeloider Leukämie als Tumorsuppressor (Yao, 2017; Chen, 2016; Wang, 2016; Faltejskova-Vychytilova, 2017) und bei Magen- und Gebärmutterhalskrebs als Onkogen (Li, 2015; Yao, 2017) definiert werden.

Franchini et al. publizierte im vergangenen Jahr Daten zur Rolle der ABO-Blutgruppen im Zusammenhang mit der Krebsart des erkrankten Patienten. Dabei wurde festgestellt, dass Patienten der BG O eine höhere Überlebenschance aufwiesen, als beispielsweise Patienten der BG A oder AB (Franchini, 2016). Da die miR-215-5p in Zellen der BG O gegenüber AA deutlich stärker exprimiert wird (Kronstein-Wiedemann, submitted 2017), und in einer Vielzahl von Krebsarten eine suppressive Wirkung aufweist, könnte sie eine Rolle in der höheren Überlebensrate der Krebspatienten mit der Blutgruppe O spielen.

## 7. Zusammenfassung

Die miR-215-5p, welche einen Teil der miR-215 darstellt, kennzeichnet sich durch eine doppelt so starke Expression in Zellen der Blutgruppe O gegenüber der Blutgruppe AA und durch eine Bindungsstelle in der 3'UTR des Transkriptionsfaktors RUNX1. Dieser besitzt eine Bindungssequenz im Intron 1 des ABO-Gens und nimmt eine regulierende Funktion während der Blutgruppe A-Antigen-Expression ein. Im Rahmen dieser Bachelorarbeit wurden Untersuchungen zur Rolle der miR-215-5p bei der, durch RUNX1-vermittelten Expression der ABO-Blutgruppen-Antigene im Verlauf der Erythropoese durchgeführt.

Anhand der ausführlichen Analysen können folgende Aussagen getroffen werden:

1. Die Überexpression der pre-miR-215 in hämatopoetischen Stammzellen führt zu einer Hemmung der Blutgruppe A-Antigene pro rote Blutzelle.
2. Die Überexpression der pre-miR-215 bewirkte ebenfalls eine Verringerung der BG A-positiven Zellen im Verlauf der Erythropoese.
3. Nach Überexpression der pre-miR-215 kommt es zu einer beschleunigten Differenzierung zu Erythrozyten somit zu einer verringerten Proliferation und zu einer Verschiebung von großen unreiferen Kolonien (BFU-Es) zu kleineren reiferen Kolonien (CFU-Es).
4. Die Inhibierung der endogenen miR-215-5p zeigt eine beschleunigte Expression der BG A innerhalb der ersten 11 Tage der Erythropoese.

## Literaturverzeichnis & Quellenverzeichnis

### Bücherverzeichnis

- Aumüller, G., Aust, G., Konrad, A., & Engele, J.:** Duale Reihe Anatomie, Georg Thieme Verlag 2007.
- Benz, C.:** Physikum exakt: Das gesamte Prüfungswissen für die 1. ÄP, Georg Thieme Verlag 2005.
- Fandrey, J., Hallek, M.:** Erythropose: Physiologie, Pathophysiologie und Algorithmus zur Abklärung von Anämien, Springer Verlag Berlin - Heidelberg 2015.
- Hoffbrand, A.V., Pettit, J.E., Moos, P.A.H., Hoelzer, D.:** Grundkurs Hämatologie, 2. aktualisierte und erweiterte Auflage, Blackwell Verlag Wien 2003.
- Knippers, R.:** Molekulare Genetik, Band 8., neubearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag 2001.
- Kügler, P.:** Der menschliche Körper: Anatomie, Physiologie, Pathologie, Elsevier Verlag 2012.
- Molineux, G., Foote M.A., Arvedson, T.:** Twenty Years of G-CSF – Clinical and Nonclinical Discoveries, Springer Verlag Basel 2012.
- Murken, J.D.:** Taschenlehrbuch der Humangenetik, Georg Thieme Verlag 2017.
- Pruitt, K.:** Progress in Molecular Biology and Translational Science - Molecular and Cellular Changes in the Cancer Cell, Volume 144, Elsevier Inc. 2016.
- Qiagen PreAnalytiX:** Blood miRNA Kit Handbook, Qiagen PreAnalytiX by PAXgene 2015.
- Rassow, J.:** Duale Reihe Biochemie, Georg Thieme Verlag 2008.
- Remmele, W.:** Pathologie. Ein Lehr- und Nachschlagebuch: Band 1, Springer Verlag 2013.
- Rowley, J.D., Le Beau, M.M., Rabbitts, T.H.:** Chromosomal Translocations and Genome Rearrangements in Cancer, Springer 2015.
- Rump, G., Braun, R., Jahn, U.-R.:** Transfusionsmedizin compact, Georg Thieme Verlag 2003.
- Schiebler, T.H.:** Anatomie: Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen, 5. Auflage, Springer Verlag 1991.
- Scholz, A.O.:** Trauma und Berufskrankheit, Volume 12, Springer Medizin Verlag 2010.
- Zwahr, A.:** Der Brockhaus in drei Bänden – Band 3, F.A. Brockhaus Leipzig 2004.

## Wissenschaftlichen Publikationen

**Barskri, A. [et al.]:** Chromatin poises miRNA- and protein-coding genes for expression, *Genome Research*, 2009, 19(19), S. 1742-1751.

**Bartel, D.P.:** MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, *Cell Press*, 2009, 136, S. 215-233.

**Blyth, K. [et al.]:** The runx genes: gain or loss of function in cancer, *Nature Reviews Cancer* 5, 2005, S. 376–387.

**Bruchova, B. [et al.]:** The Regulated Expression of miRNAs in Normal and Polycythemia Vera Erythropoiesis, *NIH Public Access*, 35 (11), 2007, S. 1657-1667.

**Chen, Z. [et al.]:** MicroRNA-215 suppresses cell proliferation, migration and invasion of colon cancer by repressing Yin-Yang 1, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 479(3), S. 482-488.

**Clausen, H. [et al.]:** Isolation to homogeneity and partial characterization of a histo-blood group A defined Fuc alpha 1----2Gal alpha 1----3-N-acetylgalactosaminyltransferase from human lung tissue, *The Journal of Biological Chemistry*, 1990; 265 (2), S. 1139-1145.

**Deaton, A.M. [et al.]:** CpG islands and the regulation of transcription, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2011, 25, S. 1010-1022.

**Elagib, K. E. [et al.]:** RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation, *Blood*, 2003, 101 (11), S. 4333-4341.

**Faltejskova-Vychytilova, P. [et al.]:** miR-215-2p is a tumor suppressor in colorectal cancer targeting EGFR ligand epiregulin and its transcriptional inducer HOXB9, *American Association of Cancer Research*, 2017, 77(13), Abstract #3425.

**Franchini, M. [et al.]:** The prognostic value of ABO blood group in cancer patients, *Società Italiana Medicina Trasfusionale e Immunoematologia*, 2016, 14, S. 434-440.

**Hata Y. [et al.]:** Characterization of the human ABO gene promotor in erythroid cell lineage, *Vox Sanguinis*, 2002, 82 (1), S. 39-46.

**Herkt, S.C. [et al.]:** Protein arginine methyltransferase 6 controls erythroid gene expression and differentiation of human CD34+ progenitor cells, *haematologica - Journal of the European Hematology Association*, 2017, 102.

**Hosseini-Maaf B. [et al.]:** ABO exon and intron analysis in individuals with the AweakB phenotype reveals a novel O1v-A2 hybrid allele that causes four missense mutations in the A transferase, *BMC genetics*, 2003, 4:17.

**Ichikawa, M. [et al.]:** A role for RUNX1 in hematopoiesis and myeloid leukemia, *The Japanese Society of Hematology*, 2013, 97, S. 726-734.

**Ito, Y.:** Oncogenic potential of the RUNX gene family: 'Overview', Nature Publishing Group, 2004, Bde. *Oncogene* 23(24), S. 4198–4208.

**Kim, D.H. [et al.]:** MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells, The National Academy of Science of the USA, 2008, 105(42), S. 16230-16235.

**Klein, E. [et al.]:** Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia, *International Journal of Cancer*, 1976, 18 (4), S. 421-431.

**Kominato, Y. [et al.]:** Alternative Promotor Identified between a Hypermethylated Upstream Region of Repetitive Elements and a CpG Island in Human ABO Histo-blood Group Genes, *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(40), S. 37936-37948.

**Kominato, Y. [et al.]:** Regulation of ABO gene expression, Elsevier Ireland Ltf., 2005, 7, S. 263-265.

**Konstein-Wiedemann, R. [et al.]:** Regulation of ABO blood group antigen expression by miRNA-331-3p and miR-1908-5p, *Blood*, submitted 2017.

**Kozomara, A [et al]:** miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data, *Nucleic Acids Research*, 2001, 39, S. 152-157.

**Kronstein-Wiedemann, R. [et al.]:** Inhibition of SP1 by miRNA 331-3p causes glycosyltransferase A repression and may explain certain weak A (Ax01v), *Transfusion Medicine and Hemotherapy* by Karger Publishers, 2016, 43(1), S. 25-26.

**Kuvardina, O.N. [et al.]:** RUNX1 repress the erythroid gene expression program during megakaryocytic differentiation, *Blood*, 2015, 125(23), S. 3570-3579.

**Landsteiner, K.:** Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe, *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten*, 1900, Abt. 27, S. 357–362.

**Lee, Y. [et al.]:** MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II, *European Molecular Biology Organization*, 2004, 23(20), S. 4051–4060.

**Li, N. [et.al]:** miR-125 promotes malignant progression of gastric cancer by targeting RUNX1, *Oncotarget*, 2015, 7(4), S. 4817-4828.

**Miyoshi, H. [et al.]:** t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 1991, 88 (23), S. 10431–10434.

**Nicholson, K.M. [et al.]:** The protein kinase B/ Akt signalling pathway in human malignancy, *Cell Signaling*, 2002, 14(5), S. 381-395.

**Nimmo, E. [et al.]:** RUNX transcription factors at the interface of stem cells and cancer, *Portland Press - Biochemical Journal*, 2017, 474(11), S. 1755-1768.

**Nisha, P. [et al.]:** Analysis of Chromatin Structure of Genes Silenced by heterochromatin in Trans, *Genetics Society of America*, 2008, 179(1), S. 359-373.

**Olsson, M. L. [et al.]:** Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles, *The American Society of Hematology*, 2001, 98(5), S. 1585-1593.

**Place, R.F. [et al.]:** MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promotor sequences, *The National academy of Sciences of the USA*, 2008, 105(5), S. 1608-1613.

**Sano, R. [et al.]:** A 3.0-kb Deletion including an erythroid cell-specific regulatory element in intron 1 of the ABO gene in an individual with the Bm phenotype, *Vox Sanguinis*, 2015, 108(3), S. 310-313.

**Sano, R. [et al.]:** Expression of ABO blood-group genes is dependent upon an erythroid cell-specific regulatory element that is deleted in persons with the Bm phenotype, *The American Society of Hematology*, 2012, 119(12), S.5301-5310.

**Sano, R. [et al.]:** The 3' flanking region of the human ABO histo-blood group gene is involved in negative regulation of gene expression, *Elsevier Ireland Ltd.*, 2011, 13(1), S. 22-29.

**Schrenzenmeier, H.:** Aus der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie – Mitteilungen, *Transfusionsmedizin*, 2014, 4(4), S. 209-210.

**Shivdasani, R. A.:** MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation, *The American Society of Hematology*, 2006, 108(12), S. 3646-3653.

**Sood, R. [et al.]:** Role of RUNX1 in hematological malignancies, *Blood*, 2017, 129(15), S. 2070-2082.

**Stenvang, J. [et al.]:** Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides, *Silence Journal*, 2012, 3(1), S.1.

**Storry, J.R. [et al.]:** International society of blood transfusion working party on red cell immunogenetics and terminology: report of the Seoul and London meetings, *ISBT Science Series*, 2016, 11(2), S. 118-122.

**Storry, J.R. [et al.]:** The ABO blood group system revisited: a review and update, *Immunohematology*, 2009, 25, S. 48-59.

**Sun, X. [et al.]:** MicroRNA Regulation of HDL Homeostasis, *The HDL Handbook - Biological Functions and Clinical Implications*, 2017, 10, S. 209-229.

**Sun, Z. [et al.]:** miR-150 inhibits terminal erythroid proliferation und differentiation, *Oncotarget*, 2015, 40(6), S. 43033-43047.

**Takahashi, Y. [et al.]:** Deletion of the RUNX1 binding site in the erythroid cell-specific regulatory element of the ABO gene in two individuals with the Am phenotype, *Vox Sanguinis*, 2014, 106(2), S. 167-175.

**Thuresson, B. [et al.]:** ABO transcript levels in peripheral blood and erythropoietic culture show different allele-related patterns independent of the CBE/NF-Y enhancer motif and multiple novel allele-specific variations in the 5' and 3'-noncoding regions, *Immunohematology*, 2008, 48, S. 493-504.

- van Loghem, J. J. [et al.]:** Two A Antigens with Abnormal Serologic Properties, *Vox Sanguinis*, 1957, 2(1), S. 16-24.
- Vasilatou, D. [et al.]:** The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis, *European Journal of Hematology*, 2009, 84(1), S. 1-16.
- Wang, Y.-X. [et.al]:** Reduced miR-215 expression predicts poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia, *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 2016, 46(4), S. 350-356.
- Webber, B.R. [et al.]:** DNA methylation of RUNX1 regulatory regions correlates with transition from primitive to define hematopoietic potential in vitro und in vivo., *Blood*, 2013, 122(17), S. 2978-2986.
- Winter, J. [et al.]:** Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation, *Nature Cell Biology*, 2009, 11, S. 228-234.
- Yamamoto, F. [et al.]:** Review: ABO blood group system - ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-B, A and B glycosyltransferases, and ABO genes, *Immunohematology*, 2004, 20, S. 3-22.
- Yao, J. [et.al]:** MicroRNA-215 acts as a tumor suppressor in breast cancer by ttargeting AKT serin/threonine kinase 1, *Oncology Letters*, 2017, 14(1), S. 1097-1104.
- Yi, R. [et al.]:** Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs, *Genes & Development: Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2003, 17(24), S. 3011-3016.

## Sonstige Literaturquellen

- Gerhard, A.,** Identifikation der p53-zielgene phlda3 und sestrin2 als Teil eines mTOR-vermittelten Seneszenz-Signalwegs, Dissertation, Medizinische Fakultät Charité - Universitätsklinikum Berlin, Halle (Saale) 2017.
- Schmidt, L.,** Die Rolle des Transkriptionsfaktors RUNX1 bei der Regulation des Blutgruppe A-Antigens im Verlauf der Erythropoese, Belegarbeit zum Betriebspraktikum, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus an der TU Dresden Institut für Transfusionsmedizin, Hochschule Anhalt - Fachbereich Angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik, Dresden 2017.

## Internetquellen

**Applied Biosystems**, Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR

[http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_042380.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042380.pdf)

Abfrage 02.11.2017

**Bio Rad**, What is Real-Time PCR (qPCR)?

<http://www.bio-rad.com/de-de/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr>

Abfrage am 02.11.2017

**Biosettia**, lentiviral miRNA inhibitor

<http://biosettia.com/download/protocols/biosettia-lentiviral-mirna-inhibitor-manual.pdf>

Abfrage 02.12.2017

**Biosettia**, miRNA lentiviral expression vector

<http://biosettia.com/download/protocols/biosettia-mirna-lentiviral-expression-vector-manual.pdf>

Abfrage 02.12.2017

**Genetic Engineering & Biotechnology News**, Number of microRNAs in Human Genome Skyrockets

<https://www.genengnews.com/gen-news-highlights/number-of-micrnas-in-human-genome-skyrockets/81250958/>

Abfrage am 02.12.2017

**medi-learn.de**, Pentosephosphatweg im Erythrozyten [PDF]

[http://www.medi-learn.de/seiten/errata/pdf/BC3\\_S\\_57\\_1\\_2\\_3.pdf](http://www.medi-learn.de/seiten/errata/pdf/BC3_S_57_1_2_3.pdf)

Abfrage am 05.11.2017

**Mehrke, G.**, Biotechnologie Hochschule Ulm „Transkription bei Pro- und Eukaryoten“

<http://www.u-helmich.de/bio/gen/reihe2/23/Ulm1.pdf>

Abfrage am 02.11.2017

**miRnalyze**, RUNX1

<http://www.mirnalyze.in/gene/RUNX1>

Abfrage am 05.11.2017

**New England Biolabs**, cDNA Synthesis

<https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-preparation/reverse-transcription-cdna-synthesis>

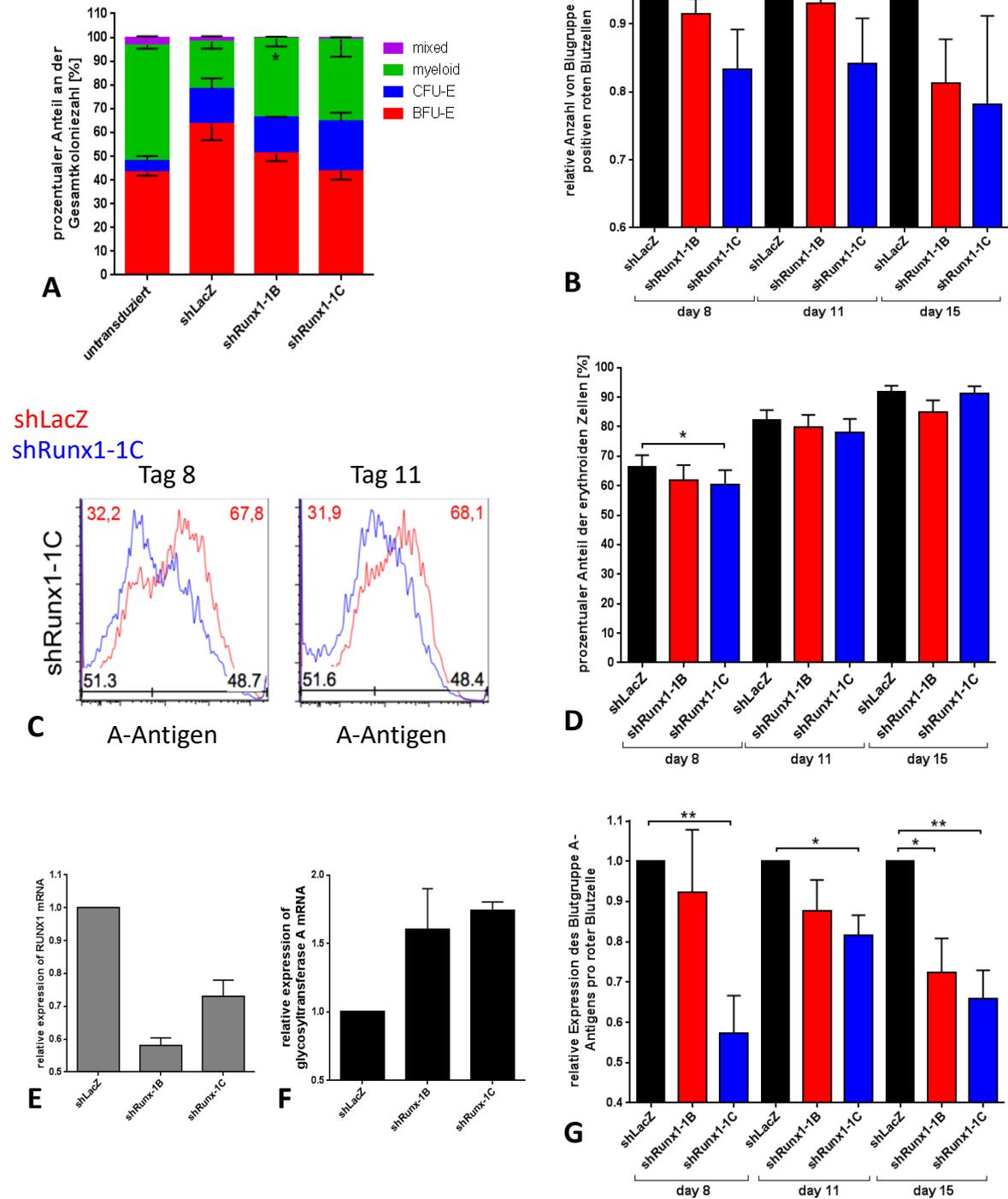
Abfrage am 02.11.2017

## Anhang

## Anhangverzeichnis

A - Zusammenfassung der Daten aus den Experimenten mit shRNAs.....	A2
B - Darstellung der MicroArray-Ergebnisse.....	A3
C - Darstellung der verwendeten lentiviralen Vektoren .....	A4
D - Tabellarische Auflistung der ermittelten Zellzahlen.....	A5
E - Auswertung der CFU-Assay-Analyse, Übersicht über die Anzahl der einzelnen Koloniearten bezogen auf die Gesamtkoloniezahl .....	A6
F - Durchflusszytometrische Analyse, Berechnung der jeweiligen Anteile an CD235a- und BG A-positiven Zellen, sowie der Anteile an BG A-Antigen.....	A9
G - Tabellarische Auflistung der RNA-Konzentrationen nach der Reversen Transkription.....	A11
H - Dotplot-Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse mit mCherry und GFP .....	A12
I - Auswertung der Real-time PCR-Daten durch die $\Delta\Delta Ct$ -Methode .....	A13

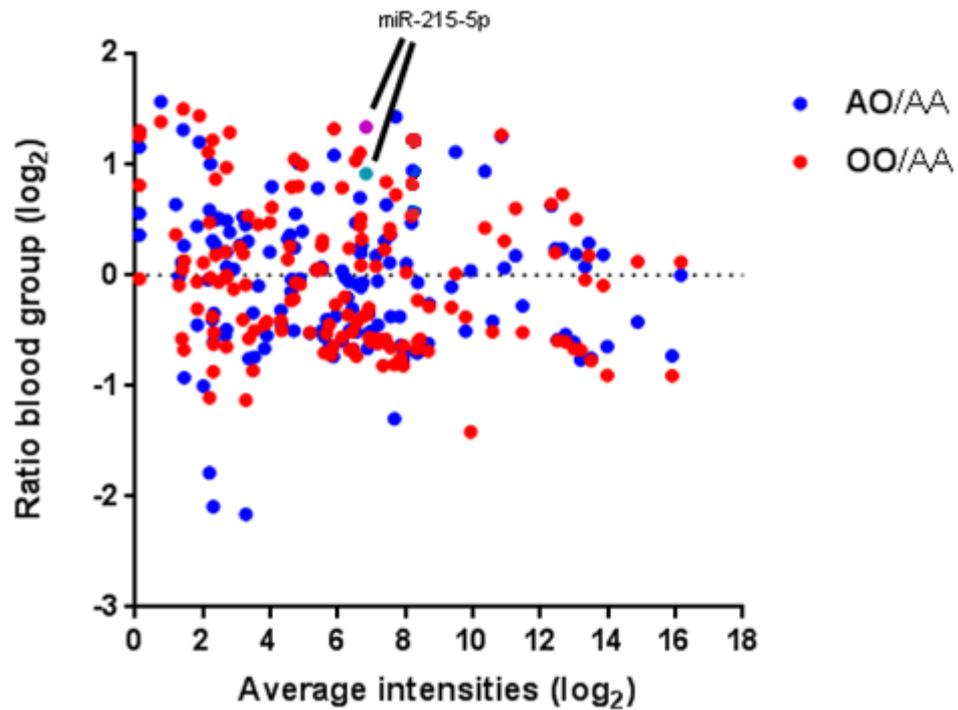
## Anhang A



**Abbildung 11: Zusammenfassende Übersicht der Daten aus den Experimenten mit shRNAs**

Dargestellt sind die prozentualen Anteile der jeweiligen Kolonienart an der Gesamtkoloniezahl (A), die relative Anzahl an BG A-positiven erythroiden Zellen bezogen auf die Kontroll-shRNA shLacZ im Verlauf der Erythropoese (B), die Expression des BG A-Antigens pro erythroide Zelle (Histogramm) (C), der prozentuale Anteil erythroider Zellen der untersuchten transduzierten Proben (D), die relative Expression der RUNX1-mRNA (E), sowie der Glykosyltransferase-A-mRNA (F) bezogen auf die shLacZ-Kontrolle und die Expression des BG A-Antigens pro erythroide Zelle (G). In allen Diagrammen wurde der SEM-Wert und auftretende statistische Signifikanzen gekennzeichnet. Für eine statistische Signifikanz bei  $p < 0,05$  wurde (\*), bei  $p < 0,01$  (\*\*) vergeben.

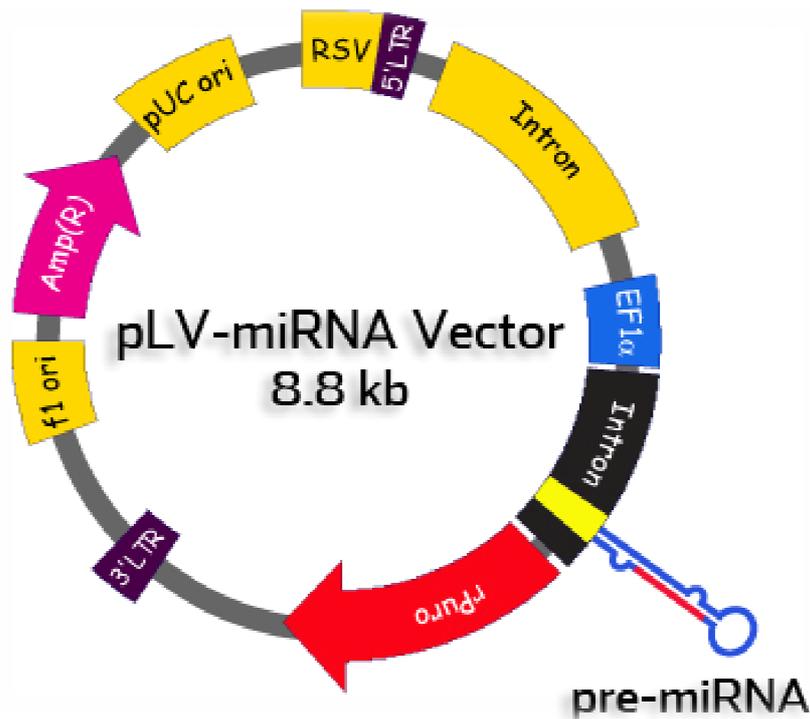
## Anhang B



**Abbildung 12: Darstellung der MicroArray-Ergebnisse**

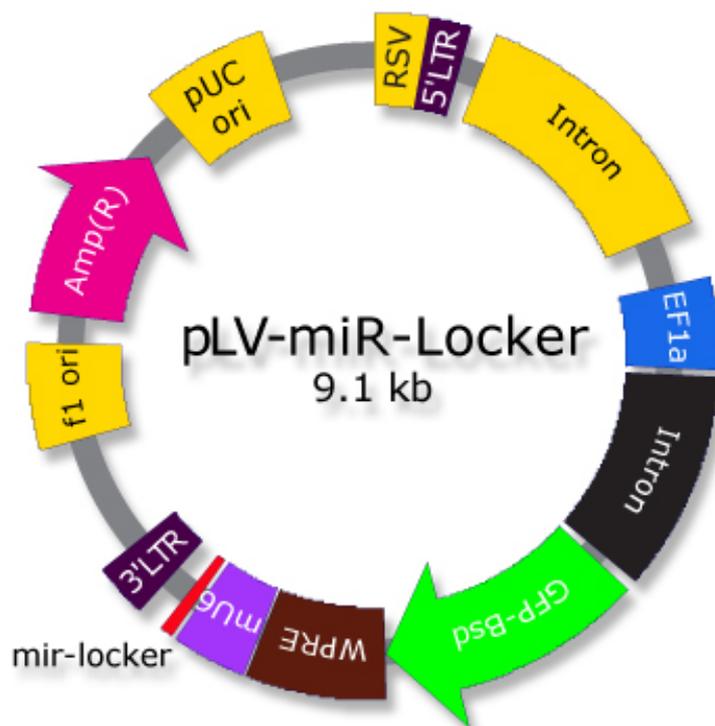
Dargestellt sind die MicroArray-Profil-Daten von signifikant hoch- bzw. herunterregulierten miRNAs in Erythrozyten verschiedener Genotypen verglichen mit dem homozygoten Genotyp. N=3 verschiedene Spender pro Blutgruppe (Kronstein-Wiedemann, submitted 2017).

## Anhang C



**Abbildung 13: Darstellung des pLV-miRNA Vektors**

Gezeigt ist der lentivirale Vektor für die Überexpression der miRNA-215, welcher mit einem rot-fluoreszierendem Puromycin-Gen (mCherry) ausgestattet ist (Biosettia, 2011).



**Abbildung 14: Darstellung des pLV-miR-Locker-Vektors**

Dargestellt ist der pLV-miR-Locker-Vektor zur Herunterregulierung der endogenen miRNA-215-5p, welcher ein grün-fluoreszierendes Blasticidin-Gen (GFP) enthält (Biosettia, 2011).

## Anhang D

**Tabelle 11: Ermittelte Zellsuspensions-Volumina, Zellzahlen pro Milliliter, sowie die Gesamtzellzahl der transduzierten Proben an verschiedenen Tagen der Kultivierung. N = 3 Experimente**

Versuch I - Tag 8				Versuch I - Tag 11			Versuch I - Tag 15		
Proben	ml	Zell- zahl/ml	Gesamt- zellzahl	ml	Zell- zahl/ml	Gesamt- zellzahl	ml	Zell- zahl/ml	Gesamt- zellzahl
mock	1,8	432000	777600	6,0	1410000	8460000	5,2	3310000	17212000
miR-215	2,6	180000	468000	3,1	1300000	4030000	1,5	2250000	3375000
L-mock	13,6	541000	7357600	40,0	1660000	66400000	13,0	3650000	48910000
L-miR-215	6,5	377000	2450500	6,0	3510000	21060000	13,0	1570000	20253000

Versuch II - Tag 8				Versuch II - Tag 11			Versuch II - Tag 15		
Proben	ml	Zell- zahl/ml	Gesamt- zellzahl	ml	Zell- zahl/ml	Gesamt- zellzahl	ml	Zell- zahl/ml	Gesamt- zellzahl
mock	2,7	290000	783000	4,2	727000	3053400	0,9	4220000	3755800
miR-215	2,7	186000	502200	3,4	908000	3087200	0,8	705000	585150
L-mock	17,8	388000	6906400	40,0	952000	38080000	13,1	2290000	29999000
L-miR-215	6,5	224000	1456000	12,4	1220000	15128000	8,3	2560000	21248000

Versuch III - Tag 8				Versuch IV - Tag 11			Versuch IV - Tag 15		
Proben	ml	Zell- zahl/ml	Gesamt- zellzahl	ml	Zell- zahl/ml	Gesamt- zellzahl	ml	Zell- zahl/ml	Gesamt- zellzahl
mock	3,6	427000	1537200	11,0	1530000	16830000	10,1	4210000	42521000
miR-215	5,2	602000	3130400	25,0	1020000	25500000	18,0	3630000	65340000
L-mock	15,2	377000	5730400	32,8	1820000	59696000	29,6	5370000	158952000
L-miR-215	9,0	459000	4131000	17,0	1610000	27370000	20,2	5100000	103020000

## Anhang E

**Tabelle 12: Übersicht über die Gesamtkolonieanzahl, sowie die Anzahl der einzelnen Kolonie-Arten der miR-215-Probe.** Außerdem ist der berechnete Mittelwert und prozentuale Anteil innerhalb der verschiedenen Fraktionen dargestellt. Die Daten wurden aus der CFU-Assay-Analyse mit miR-215-transduzierten Zellen aus N = 4 Versuchen mit unabhängigen Spendern erhalten.

miR-215 [Kolonien/Well]				Total M		Total E	
	Total E	Total M	Total	GEMM	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
<b>Versuch I</b>	138	54	192	2	52	50	88
	142	49	191	1	48	59	83
	120	47	167	1	46	32	88
<b>Versuch II</b>	24	78	102	0	78	1	23
	59	56	115	0	56	10	49
	36	78	114	0	78	5	31
<b>Versuch III</b>	93	28	121	1	27	25	68
	113	12	125	0	12	33	80
	124	14	138	0	14	35	89
<b>Versuch IV</b>	55	65	120	0	65	24	31
	87	36	123	0	36	36	51
	78	44	122	0	44	28	50
<b>∅</b>	89,08	46,75	135,83	0,42	46,33	28,17	60,92
<b>%</b>	65,58%	34,42%	100,00%	0,89%	99,11%	31,62%	68,38%

**Tabelle 13: Übersicht über die Gesamtkolonieanzahl, sowie die Anzahl der einzelnen Kolonie-Arten der mock-Probe.** Außerdem ist der berechnete Mittelwert und prozentuale Anteil innerhalb der verschiedenen Fraktionen dargestellt. Die Daten wurden aus der CFU-Assay-Analyse mit mock-transduzierten Zellen aus N = 4 Versuchen mit unabhängigen Spendern erhalten.

mock [Kolonien/Well]				Total M		Total E	
	Total E	Total M	Total	GEMM	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
<b>Versuch I</b>	98	38	136	0	38	43	55
	77	36	113	0	36	45	32
	106	59	165	0	59	53	53
<b>Versuch II</b>	80	19	99	0	19	20	60
	88	20	108	0	20	22	66
	86	30	116	0	30	20	66
<b>Versuch III</b>	125	27	152	2	25	50	75
	100	29	129	0	29	38	62
	112	36	148	0	36	48	64
<b>Versuch IV</b>	100	30	130	2	28	67	33
	84	25	109	1	24	57	27
	96	48	144	0	48	66	30
<b>∅</b>	96,00	33,08	129,08	0,42	32,67	44,08	51,92
<b>%</b>	74,37%	25,63%	100,00%	1,26%	98,74%	45,92%	54,08%

**Tabelle 14: Übersicht über die Gesamtkolonieanzahl, sowie die Anzahl der einzelnen Kolonie-Arten der Locker-miR-215-5p.** Außerdem ist der berechnete Mittelwert und prozentuale Anteil innerhalb der verschiedenen Fraktionen dargestellt. Die Daten wurden aus der CFU-Assay-Analyse mit Locker-miR-215-5p- (L-miR-215-5p) transduzierten Zellen aus N = 4 Versuchen mit unabhängigen Spendern erhalten.

L-miR-215-5p [Kolonien/Well]				Total M		Total E	
	Total E	Total M	Total	GEMM	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Versuch I	76	32	108	1	31	39	37
	118	32	150	0	32	82	36
	110	26	136	0	26	59	51
Versuch II	33	24	57	0	24	16	17
	30	9	39	0	9	8	22
	35	33	68	0	33	13	22
Versuch III	79	14	93	0	14	48	31
	63	8	71	0	8	39	24
	92	7	99	0	7	64	28
Versuch IV	62	20	82	0	20	53	9
	52	12	64	1	11	42	10
	65	17	82	1	16	53	12
∅	67,92	19,50	87,42	0,25	19,25	43,00	24,92
%	77,69%	22,31%	100,00%	1,28%	98,72%	63,31%	36,69%

**Tabelle 15: Übersicht über die Gesamtkolonieanzahl, sowie die Anzahl der einzelnen Kolonie-Arten der Locker-mock-Probe.** Außerdem ist der berechnete Mittelwert und prozentuale Anteil innerhalb der verschiedenen Fraktionen dargestellt. Die Daten wurden aus der CFU-Assay-Analyse mit Locker-mock- (L-mock) transduzierten Zellen aus N = 4 Versuchen mit unabhängigen Spendern erhalten.

L-mock [Kolonien/Well]				Total M		Total E	
	Total E	Total M	Total	GEMM	CFU-GM	BFU-E	CFU-E
Versuch I	95	28	123	1	27	49	46
	75	30	105	1	29	45	30
	65	29	94	0	29	41	24
Versuch II	28	19	47	0	19	10	18
	41	18	59	0	18	14	27
	41	16	57	0	16	14	27
Versuch III	97	11	108	0	11	38	59
	52	7	59	0	7	23	29
	88	10	98	0	10	41	47
Versuch IV	50	12	62	0	12	39	11
	76	16	92	0	16	63	13
	62	15	77	0	15	41	21
∅	64,17	17,58	81,75	0,17	17,42	34,83	29,33
%	78,49%	21,51%	100,00%	0,95%	99,05%	54,29%	45,71%

**Tabelle 16: Mittelwerte und Standardabweichung der jeweiligen Kolonie-Art (CFU-GEMM, -GM, -E und BFU-E) an der Gesamtkoloniezahl (ALL). Dargestellt sind die entsprechenden Koloniezahlen innerhalb N = 4 Versuche mit unabhängigen Spendern, sowie die totalen Mittelwerte und Standardabweichungen (TOTAL) und die jeweiligen prozentualen Anteile (TOTAL [%])**

Proben [Kolonien/Well]		Mittelwert					Standardabweichung				
		ALL	CFU- GEMM	CFU- GM	BFU- E	CFU- E	ALL	CFU- GEMM	CFU- GM	BFU- E	CFU- E
<b>V-I</b>	mock	138	0	44	47	47	26	0	13	5	13
	miR-215	183	1	49	47	86	14	1	3	14	3
	locker-mock	107	1	28	45	33	15	1	1	4	11
	l-miR-215-5p	131	0	30	60	41	21	1	3	22	8
<b>V-II</b>	mock	108	0	23	21	64	9	0	6	1	3
	miR-215	110	0	71	5	34	7	0	13	5	13
	locker-mock	54	0	18	13	24	6	0	2	2	5
	l-miR-215-5p	55	0	22	12	20	15	0	12	4	3
<b>V-III</b>	mock	128	1	33	63	30	18	1	13	6	3
	miR-215	122	0	48	29	44	2	0	15	6	11
	locker-mock	77	0	14	48	15	15	0	2	13	5
	l-miR-215-5p	76	1	16	49	10	10	1	5	6	2
<b>V-IV</b>	mock	143	1	30	45	67	12	1	6	6	7
	miR-215	128	0	18	31	79	9	1	8	5	11
	locker-mock	88	0	9	34	45	26	0	2	10	15
	l-miR-215-5p	88	0	10	50	28	15	0	4	13	4
<b>TOTAL</b>	mock	129	0	33	44	52	16	1	9	5	7
	miR-215	136	0	46	28	61	8	0	10	7	10
	locker-mock	81	0	17	35	29	15	0	2	7	9
	l-miR-215-5p	87	0	19	43	25	15	0	6	11	4
<b>TOTAL [%]</b>	mock	100	0	26	34	40	0	1	7	4	5
	miR-215	100	0	34	21	45	0	0	7	5	7
	locker-mock	100	0	21	43	36	0	0	2	9	11
	l-miR-215-5p	100	0	22	49	29	0	0	7	13	5

## Anhang F

**Tabelle 17: Prozentualer Anteil an CD235a-positiven Zellen der transduzierten Proben aus N = 3 Versuchen mit unabhängigen Spendern, sowie berechnete Standardabweichung (STABW), dargestellt sind die prozentualen Werte [%]**

Probe		Tag 8	Tag 11	Tag 15
<b>VI</b>	mock	72	93	90
	miR-215	89	97	91
	locker-mock	71	87	95
	locker-miR-215-5p	75	67	85
<b>VII</b>	mock	71	94	90
	miR-215	92	97	93
	locker-mock	86	97	97
	locker-miR-215-5p	86	96	97
<b>VIII</b>	mock	51	74	87
	miR-215	71	80	87
	locker-mock	58	85	84
	locker-miR-215-5p	58	87	86
<b>STABW</b>	mock	12	11	2
	miR-215	12	10	3
	locker-mock	14	6	7
	locker-miR-215-5p	14	15	7

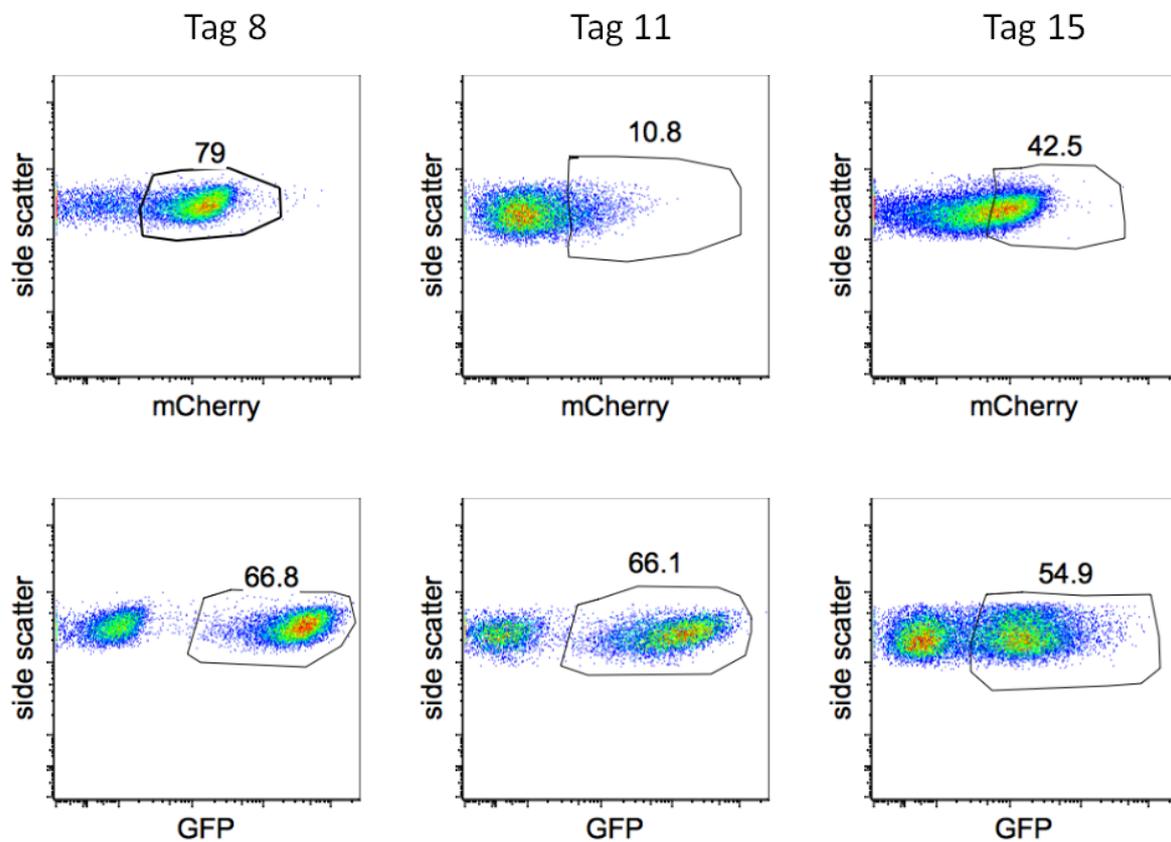
**Tabelle 18: Prozentualer Anteil an BG A-positiven Blutzellen der transduzierten Proben bezogen auf die gesamte erythroide Population aus N = 3 Versuchen mit unabhängigen Spendern, sowie berechnete Standardabweichung (STABW), dargestellt sind die prozentualen Werte [%]**

Probe		Tag 8	Tag 11	Tag 15
<b>VI</b>	mock	91	82	65
	miR-215	88	73	60
	locker-mock	85	93	74
	locker-miR-215-5p	89	97	71
<b>VII</b>	mock	91	81	68
	miR-215	90	78	69
	locker-mock	87	87	68
	locker-miR-215-5p	89	88	66
<b>VIII</b>	mock	74	77	61
	miR-215	75	71	56
	locker-mock	65	69	76
	locker-miR-215-5p	72	66	74
<b>STABW</b>	mock	10	3	3
	miR-215	8	4	6
	locker-mock	12	12	4
	locker-miR-215-5p	10	16	4

**Tabelle 19: Prozentualer Anteile der errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen an CD235a-, BG A-positiven Zellen und dem Anteil an BG A-Antigen pro erythroider Zelle aus N = 3 Versuchen mit unabhängigen Spendern, dargestellt sind die prozentualen Werte [%]**

Probe		Mittelwerte			Standardabweichungen		
		CD235a+	BGA+	Antigen/Zelle	CD235a+	BGA+	Antigen/Zelle
<b>T8</b>	empty	100	100	100	0	0	0
	miR-215	130	99	67	7	3	19
	L-empty	100	100	100	0	0	0
	L-miR-215	102	106	156	3	4	5
<b>T11</b>	empty	100	100	100	0	0	0
	miR-215	105	92	74	3	4	17
	L-empty	100	100	100	0	0	0
	L-miR-215	93	100	118	14	5	38
<b>T15</b>	empty	100	100	100	0	0	0
	miR-215	102	95	89	2	5	10
	L-empty	100	100	100	0	0	0
	L-miR-215	97	97	97	7	1	8

## Anhang G



**Abbildung 15: Durchflusszytometrischen Analyse der mCherry- und GFP-positiven Zellen im Verlauf der Erythropese**

Gezeigt werden die Dotplots der durchflusszytometrischen Analyse in logarithmischer Darstellung eines repräsentativen Beispiels. Die transduzierten Zellen wurden anhand ihres, im Vektor enthaltenen Fluoreszenzgens und des Side Scatters gated. Die Vektoren der mock und miR-215 enthielten mCherry, wohingegen die Vektoren der beiden Locker-Plasmide GFP enthielten.

## Anhang H

**Tabelle 20: Dargestellt sind die mittels reverse Transkription erhalten RNA-Konzentrationen der transduzierten Proben aus N = 3 Versuchen von unabhängigen Spendern**

	Proben	RNA [ng/ $\mu$ l]	Gesamt RNA [ng]
<b>Versuch I</b>	empty	18,4	662,4
	miR-215	22,8	820,8
	L-empty	29,6	1065,6
	L-miR-215	12,9	464,4
<b>Versuch II</b>	empty	27,2	979,2
	miR-215	11,6	417,6
	L-empty	9,5	342,0
	L-miR-215	28,0	1008,0
<b>Versuch III</b>	empty	16,8	604,8
	miR-215	37,2	1339,2
	L-empty	21,6	777,6
	L-miR-215	31,6	1137,6

## Anhang I

**Tabelle 21: Auswertung des 1. Versuches der Real-time PCR- Analyse.**

Es wurden die Proben der miR-215, mock, Locker-mock (L-mock) und Locker-miR-215-5p (L-miR-215) mittels  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode analysiert. Dargestellt sind die durchschnittlichen Ct-Werte des Testgens (TE) und Housekeeping-Gens (HE), sowie der Kontrolle des Testgens (TC) und des Housekeeping-Gens (HC). Die Berechnungen der  $\Delta$ - bzw.  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte wurden nach den Gleichungen 4-6 vorgenommen.

Versuch I		Durchschnittlicher Ct-Wert [-]				$\Delta\text{CTE}$	$\Delta\text{CTC}$	$\Delta\Delta\text{Ct}$	$2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$
		Transduziert		Untransduziert					
		TE	HE	TC	HC				
<b>mock</b>	GAPDH	-	20,82	-	20,82	11,25	11,25	0,00	1,00
	BGA	32,07	-	32,07	-				
<b>miR-215</b>	GAPDH	-	20,83	-	20,82	12,14	11,25	0,89	0,54
	BGA	32,98	-	32,07	-				
<b>L-mock</b>	GAPDH	-	20,06	-	20,06	11,84	11,84	0,00	1,00
	BGA	31,90	-	31,90	-				
<b>L-miR-215</b>	GAPDH	-	25,87	-	20,06	11,83	11,84	-0,01	1,01
	BGA	37,71	-	31,90	-				
<b>mock</b>	GAPDH	-	20,82	-	20,82	10,81	10,81	0,00	1,00
	Runx1	31,64	-	31,64	-				
<b>miR-215</b>	GAPDH	-	20,83	-	20,82	11,27	10,81	0,46	0,73
	Runx1	32,10	-	31,64	-				
<b>L-mock</b>	GAPDH	-	20,06	-	20,06	11,05	11,05	0,00	1,00
	Runx1	31,10	-	31,10	-				
<b>L-miR-215</b>	GAPDH	-	25,87	-	20,06	10,10	11,05	-0,94	1,92
	Runx1	35,98	-	31,10	-				
<b>mock</b>	U6	-	19,55	-	19,55	16,00	16,00	0,00	1,00
	miR-215	35,55	-	35,55	-				
<b>miR-215</b>	U6	-	19,83	-	19,55	9,97	16,00	-6,03	65,44
	miR-215	29,79	-	35,55	-				
<b>L-mock</b>	U6	-	19,40	-	19,40	16,37	16,37	0,00	1,00
	miR-215	35,77	-	35,77	-				
<b>L-miR-215</b>	U6	-	22,39	-	19,40	17,48	16,37	1,11	0,46
	miR-215	39,87	-	35,77	-				

**Tabelle 22: Auswertung des 2. Versuches der Real-time PCR- Analyse der Proben miR-215 und mock mittels  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode.** Dargestellt sind die durchschnittlichen Ct-Werte des TEs, HEs, TCs und HCs. Die Berechnungen der  $\Delta$ - bzw.  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte wurden nach Gleichung 4-6 vorgenommen.

Versuch II		Durchschnittlicher Ct-Wert [-]				$\Delta\text{CTE}$	$\Delta\text{CTC}$	$\Delta\Delta\text{Ct}$	$2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$
		Transduziert		Untransduziert					
		TE	HE	TC	HC				
mock	GAPDH	-	20,85	-	20,85	13,85	13,85	0,00	1,00
	BGA	34,70	-	34,70	-				
miR-215	GAPDH	-	28,68	-	20,85	13,32	12,26	1,06	0,48
	BGA	42,00	-	33,11	-				
mock	GAPDH	-	20,85	-	20,85	11,82	11,82	0,00	1,00
	Runx1	32,67	-	32,67	-				
miR-215	GAPDH	-	28,68	-	20,85	12,32	11,82	0,50	0,71
	Runx1	41,00	-	32,67	-				
mock	U6	-	19,49	-	19,49	16,43	16,43	0,00	1,00
	miR-215	35,92	-	35,92	-				
miR-215	U6	-	24,51	-	19,49	5,65	16,43	-10,77	1749,65
	miR-215	30,16	-	35,92	-				

**Tabelle 23: Auswertung des 3. Versuches der Real-time PCR- Analyse der Proben miR-215, mock, Locker-mock (L-mock) und Locker-miR-215-5p (L-miR-215) mittels  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode.** Dargestellt sind die durchschnittlichen Ct-Werte des TEs, HEs, TCs und HCs. Die Berechnungen der  $\Delta$ - bzw.  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte wurden nach Gleichung 4-6 vorgenommen.

Versuch III		Durchschnittlicher Ct-Wert [-]				$\Delta\text{CTE}$	$\Delta\text{CTC}$	$\Delta\Delta\text{Ct}$	$2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$
		Transduziert		Untransduziert					
		TE	HE	TC	HC				
mock	GAPDH	-	23,45	-	23,45	9,81	9,81	0,00	1,00
	BGA	33,26	-	33,26	-				
miR-215	GAPDH	-	20,31	-	23,45	10,73	9,81	0,92	0,53
	BGA	31,05	-	33,26	-				
L-mock	GAPDH	-	25,17	-	25,17	9,58	9,58	0,00	1,00
	BGA	34,74	-	34,74	-				
L-miR-215	GAPDH	-	21,36	-	25,17	9,80	9,58	0,22	0,86
	BGA	31,16	-	34,74	-				
mock	GAPDH	-	23,45	-	23,45	10,23	10,23	0,00	1,00
	Runx1	33,68	-	33,68	-				
miR-215	GAPDH	-	20,31	-	23,45	10,77	10,23	0,54	0,69
	Runx1	31,08	-	33,68	-				
L-mock	GAPDH	-	25,17	-	25,17	10,17	10,17	0,00	1,00
	Runx1	35,33	-	35,33	-				
L-miR-215	GAPDH	-	21,36	-	25,17	8,57	9,67	-1,10	2,14
	Runx1	29,92	-	34,83	-				
mock	U6	-	18,04	-	18,04	17,22	17,22	0,00	1,00
	miR-215	35,27	-	35,27	-				
miR-215	U6	-	17,76	-	18,04	9,70	17,22	-7,52	183,76
	miR-215	27,46	-	35,27	-				
L-mock	U6	-	18,68	-	18,68	16,57	16,57	0,00	1,00
	miR-215	35,25	-	35,25	-				
L-miR-215	U6	-	17,03	-	18,68	18,14	16,57	1,57	0,34
	miR-215	35,17	-	35,25	-				

**Tabelle 24: Mittelwerte und Standardabweichung der mittels  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ermittelten Daten der PCR-Analyse**

Probe	Mittelwert			Standardabweichung		
	GAPDH/ BGA	GAPDH/ RUNX	U6/ MIR-215	GAPDH/ BGA	GAPDH/ RUNX	U6/ MIR-215
empty	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00
miR-215	0,52	0,71	666,28	0,03	0,02	940,1
L-empty	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00
L-miR-215	0,97	1,71	0,64	0,10	0,56	0,41

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die Bachelorarbeit mit dem Thema „Einfluss der microRNA 215-5p auf die durch RUNX1 vermittelte Expression der ABO-Blutgruppen-Antigene“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Das bearbeitete Thema wurde nicht schon früher im Rahmen einer anderen Arbeit behandelt und/oder anderswo als Prüfungsarbeit eingereicht.

---

Dresden, den 12.12.2017