

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV
des Universitätsklinikums Halle (Saale)
(Direktor: Prof. Dr. med. Hans- Joachim Schmoll)

**Funktionelle und regulatorische Analysen zur miR-21
im myeloiden Differenzierungsmodell U937**

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

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

von Maria Lehretz,

geboren am 09.11.1985 in Köthen (Anhalt)

Eröffnungsdatum: 18.07.2013

Datum der öffentlichen Verteidigung: 19.11.2014

Gutachter: PD Dr. L. Müller
Prof. Dr. M. Gekle
Prof. Dr. H. Serve

Ia Referat

Die Hämatopoese gilt als komplexer Prozess von der undifferenzierten hämatopoetischen Stammzelle bis hin zu den terminal reifen Blutzellen. Diese Kaskade unterliegt der Kontrolle verschiedener Transkriptionsfaktoren, die die Hämatopoese steuern. Seit einiger Zeit rückten dazu noch kleine, nicht-proteincodierende RNA- Moleküle, sogenannte microRNAs, in den Fokus der Forschung. Sie besitzen ebenso die Fähigkeit zur Genregulation, sodass die Funktion der microRNAs zunehmend an Bedeutung gewann. MicroRNAs sind in verschiedenste Prozesse der Differenzierung, Apoptose und Proliferation involviert. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Funktion und Regulation der miR-21 während der myeloiden Differenzierung. Innerhalb der Myelopoese konnte eine Hochregulation der bisher nur in verschiedenen Krebsen beschriebenen miR-21 gezeigt werden. Um die Funktion der miR-21 in der monozytären Differenzierung zu klären, wurde ihr Einfluss auf den M- CSF- R hin untersucht. Nach Überexpression bzw. Knock- down der miR-21 konnte eine gleichgerichtete Veränderung der Expression des M- CSF- R gezeigt werden. Außerdem scheint die miR-21 einen Einfluss auf das OnkoProtein Ski zu haben, zwischen beiden liegt eine inverse Korrelation vor. Weiterhin konnte eine putative Bindestelle der miR-21 in der 3'UTR von Ski gefunden werden. Die Regulation der miR-21 geschieht vermutlich durch den Transkriptionsfaktor PU.1, dessen Expression in der Myelopoese sowie nach Überexpression der miR-21 ansteigt. In der Literatur wurde eine putative Bindestelle von PU.1 im Promotorbereich der miR-21 beschrieben. Insgesamt ergibt sich daraus eine funktionelle Bedeutung der miR-21 innerhalb der myeloiden Differenzierung durch Wechselwirkung mit monozytären Markern (M- CSF- R) sowie Inhibition proliferativ wirkender Proteine (Ski) und weiterhin eine mögliche Regulation durch den TF PU.1.

Lehretz, Maria: Funktionelle und regulatorische Analysen zur miR-21 im myeloiden Differenzierungsmodell U937; Halle (Saale), Martin- Luther- Universität Halle- Wittenberg, Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV/ Hämatologie und Onkologie, Medizinische Fakultät, 74 Seiten, 2013

Ib Abstract

Hematopoiesis is a complex process from undifferentiated stem cells to mature blood cells. This cascade is controlled by several hematopoietic transcription factors. Recently microRNAs, small non-coding RNA- molecules, became of major interest. MicroRNAs are associated with gene regulation, cellular differentiation, apoptosis and proliferation. This thesis aimed the investigation of the functional role and regulation of miR-21 during myeloid differentiation. MiR-21 is noted for an upregulation in different neoplastic diseases. On the other hand we could show an upregulation during myelopoiesis. To analyse the functional role of miR-21 during monocytic differentiation, its influence on M-CSF-R was examined. We performed an overexpression and also a knockdown of miR-21. As a result we observed an aligned change of expression of M-CSF-R. Furthermore miR-21 seems to affect the oncoprotein Ski. We could show an inverse correlation between Ski and miR-21. In addition we found a putative binding site of miR-21 in the 3`UTR of Ski. Probably the myeloid transcription factor PU.1, which is highly expressed during myelopoiesis, and upregulated after overexpression of miR-21 as well, is involved in regulation of miR21. Target prediction tools predicted a binding site of PU.1 in the promoter region of miR-21. In conclusion we can asses a functional meaning of miR-21 during myeloid differentiation due to the interaction of miR-21 with the monocytic marker M-CSF-R and the inhibition of the proliferation-causing protein Ski. MiR-21 expression itself is probably controlled by the myeloid masterregulator PU.1. These findings support the importance of miR-21 in myeloid differentiation as a critical regulating element in the centre of a functional loop involving most important myeloid factors.

II Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Hämatopoese und Leukämien	1
1.1.1	Hämatopoese.....	1
1.1.2	Leukämien	2
1.1.3	Mechanismen der Leukämogenese	3
1.1.4	Die akut myeloische Leukämie	3
1.2	Die U937- Zelllinie als monozytäres Differenzierungsmodell	6
1.3	Die Bedeutung von M- CSF/ M- CSF- R in der Myelopoese	7
1.4	MicroRNAs in der Karzinogenese	8
1.4.1	Funktion und Biogenese	8
1.4.2	Die Funktion verschiedener MicroRNAs	10
1.4.3	Die Rolle der miR-21 in der Tumorentstehung.....	11
1.5	Transkriptionsfaktoren in der myeloiden Entwicklung	13
1.5.1	Bedeutung und Funktion der Transkriptionsfaktoren	13
1.5.2	Der TF PU.1 in der Hämatopoese.....	13
1.6	Ski in der Hämatopoese und Leukämogenese	15
2	Zielstellung	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Materialien	18
3.1.1	Reagenzien.....	18
3.1.2	Kits.....	20
3.1.3	Antikörper für Western Blot und FACS- Analyse.....	20
3.1.4	Plasmide und LNA	21
3.1.5	Primer für PCR (mRNA, microRNA).....	21
3.1.6	Bakterien und Zelllinien.....	21
3.1.7	Pufferlösungen und Kulturmedien.....	22
3.1.8	Verbrauchsmaterial.....	23
3.1.9	Geräte	24
3.2	Methoden	25
3.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	25
3.2.1.1	RNA- Präparation mit Trizol	25
3.2.1.2	RNA- Messung.....	25
3.2.1.3	Reverse Transkription der MicroRNAs	25
3.2.1.4	Realtime- PCR für MicroRNAs	26

3.2.1.5	Reverse Transkription für mRNA	27
3.2.1.6	Realtime- PCR für mRNA.....	27
3.2.1.7	Semiquantitative PCR für mRNA	28
3.2.1.8	Agarose- Gelelektrophorese	29
3.2.1.9	MicroArray	29
3.2.1.10	Transformation von E.coli mit Plasmiden	29
3.2.1.11	Transiente Transfektion mittels Elektroporation	30
3.2.1.12	Transiente Transfektion mit Lipofectamin.....	30
3.2.2	Proteinchemische Methoden.....	31
3.2.2.1	Proteinisolierung	31
3.2.2.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	31
3.2.2.3	SDS- PAGE.....	31
3.2.2.4	Western Blot.....	32
3.2.2.5	Proteindetektion	32
3.2.3	Biophysikalische Methoden.....	33
3.2.3.1	Durchflusszytometrie.....	33
3.2.3.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	33
3.2.3.3	May- Grünwald- Färbung	33
3.2.4	Zellkultur	34
3.2.5	Statistik	34
4	Ergebnisse.....	35
4.1	PMA- induzierte myeloide Differenzierung von U937- Zellen.....	35
4.2	Die microRNA- Expression während der PMA- induzierten myeloiden Differenzierung von U937- Zellen	38
4.2.1	MicroArray- Analyse zum microRNA- Expressionsprofil während der PMA- induzierten myeloiden Differenzierung.....	38
4.2.2	Analyse zur Expression der miR-21 in der PMA- induzierten myeloiden Differenzierung von U937- Zellen mittels RT- qPCR	39
4.3	Funktionelle Analysen zur miR-21	40
4.3.1	Ski als putatives Ziel der miR-21.....	40
4.3.2	Die miR-21 beeinflusst die Expression des M-CSF- R in der myeloiden Differenzierung	42
4.4	Untersuchungen zur Regulation der miR-21 durch PU.1	46
4.4.1	Die Expression des Transkriptionsfaktors PU.1 korreliert mit der miR- 21- Expression in der myeloiden Differenzierung.....	46
4.4.2	PU.1- Überexpression induziert die Expression der miR-21	50
5	Diskussion.....	52
5.1	Hintergrund	52

Funktionelle und regulatorische Analysen zur miR-21 im myeloiden
Differenzierungsmodell U937

5.2	Das myeloide Differenzierungsmodell U937	52
5.3	Hochregulation der miR-21 in der myeloiden Differenzierung.....	54
5.4	Die Funktion der miR-21 innerhalb der monozytären Differenzierung	57
5.4.1	Das OnkoProtein Ski als putatives Ziel der miR-21	57
5.4.2	Die miR-21 als positiver Regulator des M- CSF- R.....	58
5.5	Die Regulation der miR-21 durch den myeloiden TF PU.1	60
5.6	Modell der Regulation und Funktion der miR-21 in der myeloiden Differenzierung (Modell U937+PMA)	62
5.7	Ausblick.....	64
6	Literaturverzeichnis	65
7	Thesen	73

III Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALL	akut lymphatische Leukämie
AML	akut myeloische Leukämie
APC	Antigen- präsentierende Zelle
APL	Akute promyelozytäre Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
ATRA	all-trans-retinoic acid/ Vitamin A- Säure/ Tretinoin
CBF β	Core binding factor β
CD	Cluster of differentiation/ Differenzierungsmerkmal
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin- Immuno- Präzipitation
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CLP	common lymphoid progenitor/ allgemeine lymphoide Vorläuferzelle
cm	Zentimeter
CMP	common myeloid progenitor/ allgemeine myeloide Vorläuferzelle
CML	chronisch myeloische Leukämie
DC	dendritic cell/ dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat/ RNase frei
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dT	Desoxyribothymidin
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence/ Lumineszenzverstärker
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMP	erythroid/megakaryozytäre Progenitorzelle
ESZ	embryonale Stammzelle
et al.	Et alii/ Bezug auf weitere Autoren und Co- Autoren
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting/ Durchflusszytometrie
FBS	Fetales bovines Serum

Funktionelle und regulatorische Analysen zur miR-21 im myeloiden
Differenzierungsmodell U937

FLT3- ITD	FMS- like Tyrosinkinase 3 interne Tandemduplikation
FLT3-WT	FMS- like Tyrosinkinase 3 Wildtyp
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HDAC	Histondeacetylase
HRP	Horse raddish peroxidase/ Meerrettichperoxidase
HPC	Hämatopoetische pluripotente Stammzelle
hsa	Homo sapiens
HSC	hematopoetic stem cell/ hämatopoetische pluripotente Stammzelle
IgG	Immunglobulin G
κ	Kappa
kb	Kilobasen
LB	lysogeny broth/ lysogene Lösung
LNA	locked nucleic acids
μ	Micro
mA	Milliampere
M- CSF- R	Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor
mg	Milligramm
min	Minuten
miR	Micro RNA
ml	Milliliter
MONA	Monozyten Adapter
MPP	multipotent progenitor cells/ multipotente Progenitorzellen
mRNA	messenger RNA/ Boten RNA
MYH11	Myosin schwere Kette
ng	Nanogramm
NK- Zellen	Natürliche Killerzellen
ORF	open reading frame/ offener Leserahmen
PBS	phosphate buffered saline/ Phosphatgepufferte Salzlösung

Funktionelle und regulatorische Analysen zur miR-21 im myeloiden
Differenzierungsmodell U937

PCR	polymerase chain reaction/ Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Hydronium- Ionen, Maß für den Säuregrad oder die Alkalität einer Lösung
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PMA	Phorbol- 12- myristat- 13- acetat
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride solution
PSG	Penicillin- Streptomycin- Glutamin
RG	Reaktionsgefäß
RIPA	Radio- Immuno- Präzipitations- Assay
RISC	RNA- induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAasin	RNAse Inhibitor
Rpm	Rounds per minute/ Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase- PCR
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS - PAGE	Sodium dodecyl sulfate –Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	small interfering RNAs
s.o.	siehe oben
Src	Sarcoma
STAT5	signal transducer and activator of transcription
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAQ	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
3`UTR	3` untranslated region/ 3` untranslatierte Region
V	Volt

1 Einleitung

1.1 Hämatopoese und Leukämien

1.1.1 Hämatopoese

Hämatopoese beschreibt eine komplexe Kaskade der Entwicklung von der HSC (hämatopoetischen Stammzelle) zu den terminal ausdifferenzierten Blutzellen.

Die embryonale und adulte Hämatopoese finden in verschiedenen Entwicklungsstufen an unterschiedlichen Orten und Organen statt, dazu zählen Dottersack, Leber, Milz, Knochenmark und Thymus [1].

Im Knochenmark existiert eine Population pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen- diese machen 0,05% aller Zellen im Knochenmark aus [1]. Zu ihnen gehören die long- term HSCs, die sowohl die Fähigkeit der lebenslangen Selbsterneuerung als auch der multilinearen Differenzierung haben [2- 6]. Aus long- term HSCs gehen short- term HSCs hervor, die die Kapazität für multilineare Differenzierung behalten, aber deren Potential zur Selbsterneuerung eingeschränkt ist [1, 7]. Aus diesen short- term- HSCs entstehen multipotente Progenitorzellen (MPPs), die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren haben. Sie besitzen das Potential, sich in spezifische Zelllinien des Blutes zu entwickeln [6]. Aus den MPPs gehen CMPs (common myeloid progenitors/ myeloide Progenitorzellen) und CLPs (common lymphoid progenitors/ lymphoide Progenitorzellen) hervor [2, 8- 10]. CLPs haben ihr myeloides Potential verloren, behalten jedoch die Fähigkeit, sich zu allen lymphoiden Zellen zu entwickeln. Aus CMPs gehen spezialisiertere Progenitorzellen hervor, z. B. granulozytär/ monozytäre oder megakaryozytär/ erythroide Vorläuferzellen. Kürzlich wurde gezeigt, dass ein basophiler Progenitor [9] sowie ein Progenitor dendritischer Zellen [10] existieren (Abbildung 1).

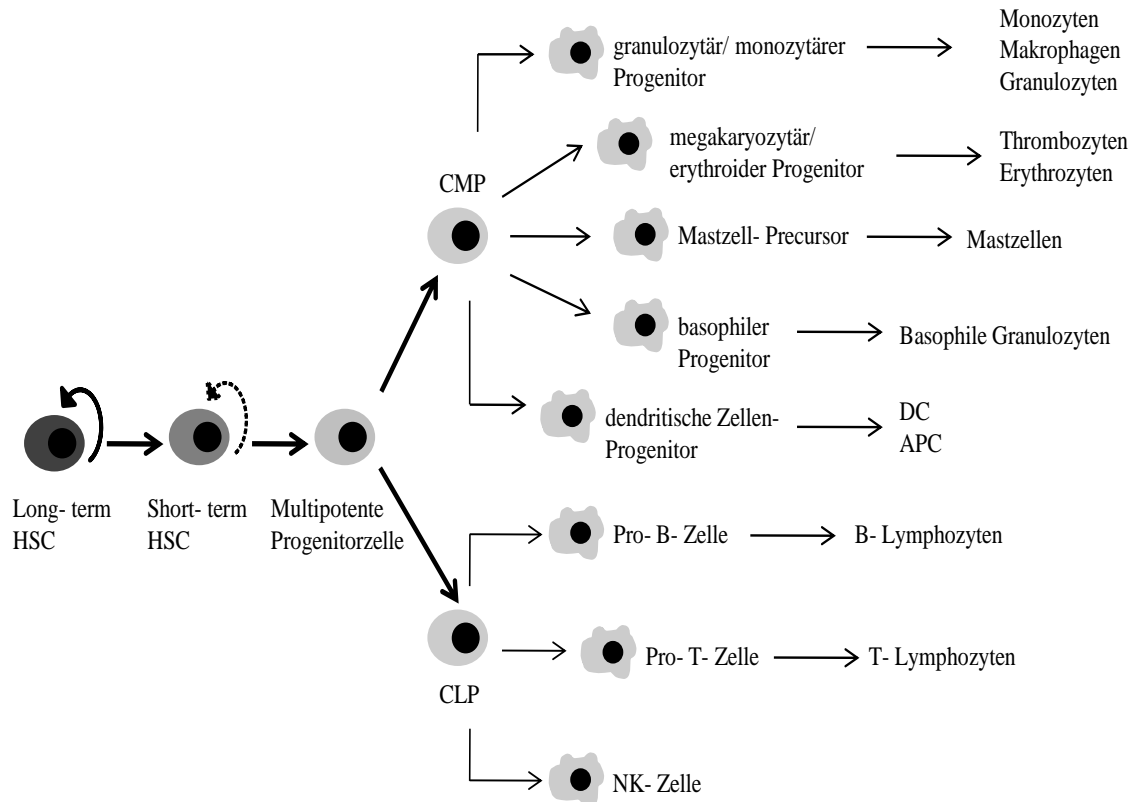


Abbildung 1: Hämatopoese nach Weissman [6]

Reife Blutzellen entstehen über verschiedene Progenitorzellen aus pluripotenten, selbst erneuerbaren Stammzellen im menschlichen Knochenmark.
HSC– hämatopoetische Stammzelle, CMP– myeloische Progenitorzelle, CLP– lymphatische Progenitorzelle, DC– dendritische Zelle, APC– antigenpräsentierende Zelle, NK– natürliche Killerzelle

1.1.2 Leukämien

Leukämien sind eine heterogene Gruppe maligner Erkrankungen der hämatopoetischen Zellen, bei denen eine ungehemmte Proliferation meist funktionsloser Leukozyten - CLL (chronisch lymphatische Leukämie) und CML (chronisch myeloische Leukämie)- oder unreifer hämatopoetischer Vorläuferzellen- AML (akut myeloische Leukämie) und ALL (akut lymphatische Leukämie)- typisch ist [11]. Am Anfang der Leukämieentstehung finden sich meist genetische Veränderungen einer einzelnen hämatopoetischen Progenitorzelle, die zu klonaler Vermehrung der unreifen Zelle führen. Die Ausbreitung dieser unreifen Zellen im blutbildenden Knochenmark führt zur

Verdrängung der regulären Hämatopoese und letztlich zu einer Ausschwemmung leukämischer Zellen ins periphere Blut [11, 12].

Die Leukämien lassen sich klinisch und immunologisch/zytologisch in vier Hauptformen unterteilen: die akut myeloische Leukämie, die akut lymphatische Leukämie, die chronisch myeloische Leukämie und die chronisch lymphatische Leukämie.

1.1.3 Mechanismen der Leukämogenese

Die Reifung der hämatopoetischen Stammzelle ist mit zwei fundamentalen Prozessen verknüpft, zum einen mit der Reduktion des Selbsterneuerungspotential und zum anderen mit dem stufenweisen Erwerb einer linien- spezifischen Identität. Diese beiden gegensätzlichen Prozesse werden von konkurrierenden genetischen Programmen gesteuert. Wenn eine HSC mit der Differenzierung beginnt, werden die Gene, die Selbsterneuerung aufrechterhalten, ausgeschaltet und Gene, die Differenzierung und Reifung verstärken, angeschaltet. Störungen und Mutationen, die die Regulation dieser Schlüsselgene beeinflussen, können zum Verlust der linienspezifischen Identität, zur genetischen Umprogrammierung und zur malignen Transformation führen [13]. Diese essenziellen Gene kodieren zumeist für Transkriptionsfaktoren und MicroRNAs, wie im Folgenden näher erläutert wird.

1.1.4 Die akut myeloische Leukämie

Die AML ist eine heterogene Gruppe hämatologischer Neoplasien, die durch einen Differenzierungsblock [14] von Blasten myeloiden Ursprungs gekennzeichnet ist. Es folgt die Apoptoseinhibition, maligne Transformation und klonale Proliferation dieser unreifen Blasten, d. h. die Entartung betrifft die Vorläuferzellen der Granulozyten und Monozyten. Im Blutbild sind vor allem unreife Blasten und vereinzelt reife, segmentkernige Granulozyten zu finden. Alle anderen Zwischenstufen fehlen (Hiatus leukaemicus) [12]. Häufig sind Faktoren involviert, die in der Zellregulation eine wichtige Rolle spielen, z. B. Ras [15], ein Protein, das in aktiver Form die Zellteilung und das Wachstum

reguliert- oder p53 [16], das als „Wächter des Genoms“ gilt und die Etablierung von Mutationen verhindert. Weiterhin wurden verschiedene chromosomale Translokationen nachgewiesen. In 25% der AMLs liegen die Translokationen t(8;21), inv(16) bzw. t(15;17) vor [17]. Die Translokation t(8;21) verursacht die Entstehung des onkogenen Fusionsproteins AML1/ETO, wodurch der hämatopoetische TF (Transkriptionsfaktor) AML1 in seiner Funktion gehemmt wird [18, 19]. AML1/ETO inhibiert den myeloiden TF PU.1, wodurch die Zelldifferenzierung ausbleibt und primitive myeloische Zellen unkontrolliert proliferieren [20].

Die leukämische Inversion inv(16) findet sich besonders häufig in akuten myelomonozytären Leukämien mit Eosinophilie (M4Eo nach FAB). Die inv(16) führt zur Entstehung des CBF β -MYH11- Fusionsgens [21, 22]. Normalerweise dimerisieren CBF β und CBF α zu einem stabilen Core Binding Factor Complex, der transkriptionelle Aktivität besitzt und die regulatorische Sequenz TGTGGT erkennt, die u.a. in hämatopoetischen Zellen vorliegt [23]. Die reguläre Expression von CBF α und CBF β sind essenziell für die hämatopoetische Differenzierung. Das CBF β -MYH11- Fusionsprotein bindet CBF α , was zu einer fehlerhaften Transkription und zur Leukämieentstehung führt [24]. Die häufig in der akuten Promyelozytenleukämie (APL; meist AML M3) auftretende Translokation t(15;17) führt zur Bildung des PML/RAR α -Fusionsgens (Fusionierung der Gene des Retinsäurerezeptors α und des Protein Promyelocytic Leukemia). Das Fusionsprotein PML/RAR α rekrutiert über Co- Repressoren wie N- Cor und mSin3 Histondeacetylasen, die über die Bildung von Heterochromatin die Transkription unterdrücken. Es folgt ein leukämischer Differenzierungsblock [25]. Die APL mit t(15;17) spricht gut auf eine Therapie mit ATRA und Anthrazyklinen an, da die HDAC- Rekrutierung durch Bindung von ATRA am Retinsäurerezeptor aufgehoben werden kann und folglich die Genexpression reaktiviert wird [26].

Die Symptome der AML lassen sich auf die Verdrängung der regulären Hämatopoese und das Fehlen funktionstüchtiger Blutzellen zurückführen. Die Patienten sind anämisch, leistungsschwach und müde. Durch die

Granulozytopenie steigt die Infektanfälligkeit. Häufig kommt es zu Pneumonien oder unklarem Fieber. Im Rahmen der Thrombozytopenie treten Petechien und Hämatome auf; die Blutungsneigung ist erhöht. Weiterhin können Knochenschmerzen, Lymphknotenschwellungen und Druckgefühl im Oberbauch durch die Infiltration von Leber und Milz (Hepatosplenomegalie) auftreten. Unbehandelt führt die Erkrankung innerhalb weniger Wochen zum Tod, der meist durch unbeherrschbare Infektionen oder Blutungen eintritt [12].

Um die AML zu gliedern, wurde 1976 die FAB (French- American- British)-Klassifikation erstellt. Sie bezieht morphologische und zytochemische Charakteristika ein und unterteilt die AML in 8 Subtypen (Tabelle 1) [27]. Die am häufigsten auftretenden AMLs sind die akute myelomonozytäre Leukämie (M4) sowie die AML mit Ausreifung (M2), die je 25% der AML- Fälle ausmachen [12].

Tabelle 1: FAB- Klassifikation der AML (nach Herold 2011)

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

Gegenwärtig erfolgt die Einteilung der AML nach der WHO- Klassifikation, die 1999 etabliert wurde. Sie berücksichtigt die morphologischen und immunphänotypischen Kriterien der FAB, bezieht jedoch auch genetische, biologische und klinische Merkmale mit ein [12] (Tabelle 2).

Tabelle 2: WHO- Klassifikation der AML (nach Herold 2011)

1. AML mit rekurrierenden zytogenetischen Anomalien
2. AML mit multilinearer Dysplasie
3. AML und MDS Therapie-assoziiert
4. AML nicht anderweitig klassifiziert

1.2 Die U937- Zelllinie als monozytäres Differenzierungsmodell

Als monozytäres Differenzierungsmodell *in vitro* wird häufig die U937- Zellreihe genutzt [22- 25]. U937 ist eine humane Zelllinie, die aus einem diffusen histiozytären Lymphom eines 37 Jahre alten männlichen Patienten stammt und zahlreiche monozytäre Eigenschaften aufweist. Durch PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) können die U937- Zellen zur Reifung induziert werden. PMA ist in der Lage, mit hoher Affinität an die zytosolisch lokalisierte PKC (Proteinkinase C) zu binden. PMA verdrängt den eigentlichen Bindungspartner DAG (Diacylglycerin) [32] aus der regulatorischen Domäne (C1- Domäne) [33]. Durch die PMA- Bindung wird die katalytische Domäne der PKC durch eine Konformationsänderung aktiviert und für Substrate zugänglich. Nach Translokation der PKC aus dem Zytosol in die Plasmamembran und den Zellkern [34] folgt eine Phosphorylierung nachgeschalteter Zielproteine [35], z.B. Raf-1 [36] oder MEKK1. Die Aktivierung des ERK- bzw. JNK- Signalweges findet statt, infolgedessen TREs (TPA responsive elements) innerhalb bestimmter Promotoren aktiviert werden. Das Ergebnis ist ein Zellzyklusarrest in der G1- Phase, wodurch Proliferationsstillstand bzw. Zelldifferenzierung initiiert werden.

Nach der Stimulation von U937- Zellen mit PMA differenzieren diese innerhalb der darauf folgenden 12-72h zu Monozyten/ Makrophagen. Dieser Prozess geht einher mit der Entwicklung verschiedener morphologischer und funktioneller Charakteristika, die Makrophagen- assoziiert sind, z. B. die Expression von IL1 (Interleukin1) oder M- CSF- R (macrophage colony stimulating factor receptor) [37].

1.3 Die Bedeutung von M- CSF/ M- CSF- R in der Myelopoese

M-CSF ist ein Zytokin, das u. a. von Monozyten und reifen Makrophagen gebildet wird [22, 23]. Der Faktor stimuliert die Differenzierung von myeloiden Progenitorzellen zu mononukleärer Phagozyten (Monozyten und Makrophagen) [24, 25] sowie die Osteoklasten- und Mikrogliaabildung aus Stammzellen [42]. Außerdem ist dieses Zytokin für das Wachstum und Überleben der monozytären Zellen verantwortlich [43]. Die Reaktionen der Makrophagen auf die Stimulation mit M- CSF sind vielfältig- morphologische Veränderungen mit zytoskelettalen Umbauten und Vakuolarisierung finden ebenso statt wie Motilitätssteigerung, Anstieg der Proteinsyntheserate und der Genexpression [38- 40]. Durch verschiedene Vorgänge (alternatives mRNA- Spleißen und proteolytische Prozesse) kann M-CSF als lösliches Glycoprotein und Proteoglycan [22, 23] oder als membranständiger Ligand exprimiert werden [48]. Auf molekularer Ebene werden die Effekte von M- CSF auf die Aktivierung des M- CSF- Rezeptors (auch CSF1- Rezeptor) zurückgeführt, der durch das c- fms Proto- Onkogen codiert wird [49]. Dieser Rezeptor wird von Zellen mononukleär- phagozytärer Herkunft exprimiert und besitzt eine intrazelluläre Tyrosinkinase. Nach Bindung des M- CSF- Liganden erfolgt die Transaktivierung des homodimeren M- CSF- Rezeptors (Autophosphorylierung). Infolge dieser Autophosphorylierung können bestimmte Proteine, z. B. Mona (Monozyten Adapter) [50], Src [51] oder STAT5 [48] über verschiedene Mechanismen mit dem M- CSF- Rezeptor interagieren. Beispielsweise führt die Aktivierung des M- CSF- Rezeptors zur Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT5 [48]- einem myeloiden TF,

der über weitere Interaktionen das zelluläre Überleben während der myeloiden Differenzierung sicher stellt [52, 53]. Testa et al. stellten fest, dass der M-CSF-R einen späten, linien-spezifischen Faktor darstellt [54]. Er wird in HPCs (hämatopoetischen pluripotenten Zellen), MKs und deren Vorläufern, der erythroiden Reihe sowie in der granulozytären Linie kaum exprimiert. Innerhalb der monozytären Linie kommt es während der Differenzierung zu einer starken Hochregulation der M-CSF-R-mRNA (semiquantitative RT-PCR), d. h. der M-CSF-R wird weder in frühen Zellen (HPCs) noch in anderen Zellreihen als der monozytären Reihe exprimiert. M-CSF-R-Defekte scheinen in Proliferationsprozesse leukämischer Zellen (AML) involviert zu sein (im Maus-Modell) [55]. Mutationen bzw. Deletionen im *c-fms-Gen* führen zu Myelodysplasien und myeloischen Leukämien, die durch den Ausfall der Differenzierung von Makrophagen und Monozyten gekennzeichnet sind [46, 47]. In der Literatur wird auch eine Rolle von M-CSF auf Fertilitätsprozesse, Haut, Nervensystem und synoviale Gewebe suggeriert [52-54].

1.4 MicroRNAs in der Karzinogenese

1.4.1 Funktion und Biogenese

MicroRNAs sind kleine, 19-25 Nukleotide lange, nicht kodierende RNA-Moleküle, die durch post-transkriptionale Regulation die Proteinbiosynthese ihrer Ziele inhibieren. Durch Anlagerung der microRNA an die 3'UTR (3'untranslatierte Region) der Ziel-mRNA wird die Translation dieser mRNA reprimiert [61]. MicroRNAs sind evolutionär hoch konserviert [62] und an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt, z. B. an Entwicklung, Zelldifferenzierung, Apoptose, Proliferation und der Stressantwort [61]. Spezifische MicroRNAs werden in speziellen Geweben zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung gebildet [62]. In einer Vielzahl von Tumoren ist das MicroRNA-Expressionprofil im Vergleich zum Ursprungsgewebe signifikant

verändert. Sie können sowohl tumorsupprimierendes als auch onkogenes Potential haben, wie im folgenden Abschnitt erklärt wird.

MicroRNAs werden zu Beginn ihrer Biogenese als pri-MicroRNA (primary microRNA) durch die RNA- Polymerase II/III transkribiert und besitzen eine Haarnadel- Struktur. Da 40% der menschlichen MicroRNAs als Cluster vorkommen, können verschiedene MicroRNAs co- transkribiert und in einer pri-MicroRNA integriert sein. Diese kann dann mehrere Haarnadel- Strukturen enthalten [63]. MicroRNAs können sowohl in intergenen Regionen als auch in Introns und Exons protein- kodierender Gene liegen [64]. Im Zellkern findet die Spaltung der pri- MicroRNA durch den Drosha- Komplex statt. Es entsteht die pre- MicroRNA (precursor microRNA), eine 60- 70 Nukleotide große Haarnadel- Struktur, deren 5'- und 3'- Termini prozessiert werden und die dann den Vorläufer für eine microRNA darstellt. Die pre- MicroRNA wird durch Exportin 5 aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert und dort durch den Dicer- Komplex gespalten. Es entsteht ein asymmetrischer, ~22 nt langer doppelsträngiger MicroRNA/MicroRNA*- Duplex. In diesem Duplex existieren zwei unterschiedliche RNA-Stränge (miRNA und miRNA*), von denen nur einer zu einem späteren Zeitpunkt an die Ziel-Sequenz im 3'-UTR der mRNA bindet [65]. Der Stern (*) benennt das miRNA-Produkt, welches in geringerem Maße in der Zelle exprimiert wird. Der Duplex wird in zwei Einzelstränge gespalten- ein Einzelstrang wird abgebaut (passenger strand), der andere (guide strand) wird an den RISC- Komplex (RNA- induced silencing complex) gebunden und stellt die aktive, reife MicroRNA dar [66]. Meist ist der Einzelstrang die aktive/reife microRNA, der am 5` Ende die niedrigste freie Energie aufweist [62]. Der MicroRNA- RISC- Komplex bindet an der 3` UTR seiner Ziel- mRNA [61]. Diese Bindung führt in den meisten Fällen zu einer translationalen Repression oder in seltenen Fällen auch zur Spaltung der Ziel- mRNA [58, 59] (Abbildung 2). Der Mechanismus der Translationsinhibierung wird durch den Grad der Komplementarität zwischen microRNA und dem MRE (miR recognition element) bestimmt.

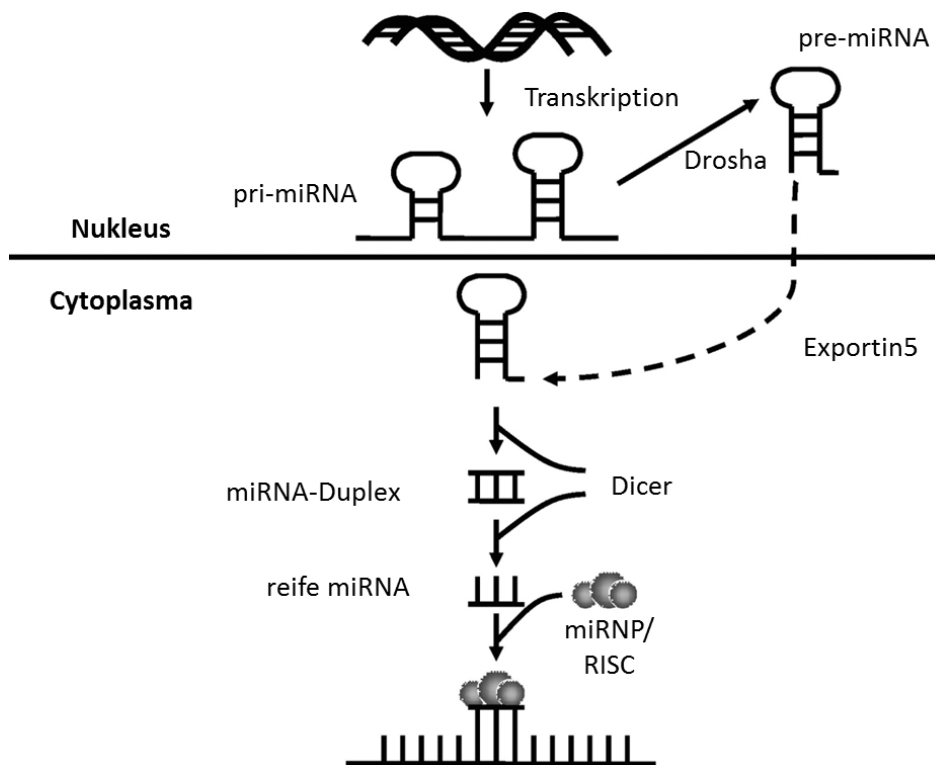


Abbildung 2: Die Biogenese der MicroRNAs (nach McDaniel 2009)

MicroRNAs werden als Haarnadel-Struktur-enthaltende Pri-miRNA transkribiert, durch den Drosha-Komplex in eine pre-miRNA gespalten und aus dem Kern exportiert. Der Dicer entfernt die Schleife - es entsteht eine doppelsträngige miRNA. Nach ihrer Aufspaltung in zwei Einzelstränge wird einer dieser Stränge abgebaut und der andere in den RISC-Komplex geladen. Dieser miRNA-RISC-Komplex inhibiert die Transkription der Ziel-mRNA.

1.4.2 Die Funktion verschiedener MicroRNAs

Eine gut untersuchte MicroRNA in der AML ist die miR-155, eine onkogene MicroRNA und die mit ihr assoziierte FLT3-ITD-Mutation (Fms-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication). Die Rezeptortyrosinkinase FLT3 ist bei ca. 30% von Patienten mit AML mutiert. Die Mutationen bewirken konstitutive, d. h. von dem aktivierenden FLT3-Liganden (FL) unabhängige Aktivität, welche zu einer erhöhten Zellproliferation und einer Apoptosehemmung führt. Dadurch ist die Prognose erheblich verschlechtert. Vergleicht man AMLs mit FLT3-WT (Wildtyp) und AMLs mit FLT3-ITD-Mutationen, so ist die miR-155 in der AML mit der ITD-Mutation sehr viel stärker exprimiert als im WT [69]. Dies lässt vermuten, dass dieser FLT3-ITD-assoziierten MicroRNA eine besondere Rolle als onkogene MicroRNA zukommt.

Es existieren auch MicroRNAs, die eine tumorsupprimierende Wirkung haben, z.B. die let-7- Familie. Sie hemmt tumorfördernde Faktoren wie RAS [70], IMP-1 und HMGA2 [31, 32]. Wird die let-7 schwächer exprimiert, kann eine verstärkte Proliferation und ein Differenzierungsblock die Folge sein. Eine Herunterregulation der let-7 wird in Ovarial-[73], Bronchial- [74], und Mammakarzinomen [75] beobachtet. Eine ebenso tumorprotektive Wirkung hat die miR-223, die in der Granulozytopoese eine zentrale Rolle spielt. Die miR-223 inhibiert ihre Zielstruktur, den TF E2F1, wodurch es zum Zellzyklusarrest in granulozytären Zellen kommt. Dieser miR-223 vermittelte Stop im Zellzyklus ist in der AML fehlreguliert. In Patientenproben (AML) konnte eine Herunterregulation der miR-223 gezeigt werden [76].

Es wird deutlich, dass MicroRNA verschiedene, mitunter auch gegensätzliche Funktionen ausüben können- was zeigt, wie wichtig die Forschung an MicroRNAs ist.

1.4.3 Die Rolle der miR-21 in der Tumorentstehung

Die miR-21 war eine der ersten microRNAs, die in Säugern identifiziert wurde. Sie ist evolutionär hoch konserviert, was eine wichtige Bedeutung dieser miR vermuten lässt. Diese Vermutung wird dadurch untermauert, dass die miR-21, obwohl im Intron eines kodierenden Gens gelegen, einen eigenen Promotor besitzt, sodass die miR-21 unabhängig transkribiert werden kann [62]. Die miR-21 ist bisher hauptsächlich in Karzinom- assoziierten Prozessen beschrieben. Sie gilt damit als onkogene miR (OncomiR), die in verschiedenen soliden Tumoren hoch exprimiert ist, z.B. in gynäkologischen Tumoren (Brustkrebs, Ovarial- und Cervixkarzinom [70- 72]), in Tumoren des Verdauungstraktes (Colonkarzinom, Leber- und Pankreaskarzinom und Oesophaguskarzinom [73- 76]) sowie in Bronchial- und Prostatakarzinomen [66, 67, 70] und zahlreichen weiteren (Tabelle 3) [85]. Die Zielstrukturen der miR-21 sind überwiegend Tumorsuppressoren wie PTEN, PDCD4 oder p53 [57, 58, 61], die durch Interaktion mit der miR inhibiert werden. Es folgen DNA- Schäden, Apoptosehemmung und unkontrolliertes Zellwachstum.

Die miR-21 wird daher hauptsächlich mit Proliferation, Anti- Apoptose und Zellmigration in Verbindung gebracht. So beschränkt sich ihre Beschreibung in der Literatur lediglich auf verschiedene Arten von Krebs. Als Regulator in Differenzierungsprozessen wurde sie bisher nicht betrachtet bzw. ihre Rolle in Reife- und Differenzierungsprozessen ist noch wenig untersucht.

Tabelle 3: Rolle und Funktion der miR-21 in verschiedenen Karzinomen (nach Krichevsky [85])

Krebsart	miR-21-Expression	Rolle der miR-21	miR-21-Zielstrukturen
Brustkrebs	Hochregulation	Zellwachstum, Apoptose, Angiogenese, Invasion	PDCD4, TPM1, Maspin
Ovarial- CA	Hochregulation	noch unbekannt	noch unbekannt
Kolorektales CA	Hochregulation	Zellmigration, Invasion und Metastasierung	PDCD4, NFIB, SPRY2
Magen- CA	Hochregulation	noch unbekannt	RECK
Leberzell- CA	Hochregulation	Zellmigration, Invasion und Proliferation	PTEN
Prostata- CA	Hochregulation	noch unbekannt	noch unbekannt
Pankreas- CA	Hochregulation	noch unbekannt	noch unbekannt
Bronchial- CA	Hochregulation	noch unbekannt	noch unbekannt
Kopf- Hals- Tumore	Hochregulation in versch. Zelllinien	noch unbekannt	noch unbekannt
Schilddrüsen- CA	Hochregulation	noch unbekannt	noch unbekannt
Cervix- CA	Hochregulation	noch unbekannt	noch unbekannt
Cholangio- CA	noch unbekannt	noch unbekannt	PTEN
B- Zell- und Hodgkin- Lymphom	Hochregulation in Zelllinien und Pat.	noch unbekannt	noch unbekannt
Gliom	Hochregulation in Primärzellen und Gliom- Zelllinien	Invasion und Zellwachstum	PDCD4, RECK, TIMP3, NFIB, APAF1, STAT3

1.5 Transkriptionsfaktoren in der myeloiden Entwicklung

1.5.1 Bedeutung und Funktion der Transkriptionsfaktoren

TF spielen eine große Rolle in der Differenzierung einer Vielzahl von Zellen und Geweben- auch in hämatopoetischen Zelllinien. Sie sind die Schlüsseldeterminanten sowohl in der Organisation der myeloiden Identität als auch in der Leukämogenese. Die meisten TF zeigen Zelllinien- spezifische und Entwicklungsstadien- begrenzte Expressionsmuster. TF fördern die Aktivierung linien- spezifischer Zielgene, wodurch Vorläuferzellen ein einziges bestimmtes Differenzierungsprogramm annehmen können. Wenn TF dysreguliert oder mutiert sind, kann es zu einem Differenzierungsblock kommen, der in vielen myeloischen Leukämien zu finden ist.

1.5.2 Der TF PU.1 in der Hämatopoese

Die Reifung myeloider Zellen wird durch eine relativ geringe Anzahl an TF organisiert. Der wohl wichtigste unter ihnen ist PU.1. Der Transkriptionsfaktor PU.1, kodiert durch das Protooncogen *Spi-1*, gehört zur ETS- Familie DNA- bindender Proteine. Die PU.1- Expression ist auf hämatopoetische Zellen beschränkt, dort allerdings ist das Expressionsprofil sehr dynamisch [86]. In frühen hämatopoetischen Zellen (HSCs, CMPs und CLPs) ist PU.1 stark exprimiert. Die hohe Expression von PU.1 in long- und short- term HSCs ist besonders relevant für die Aufrechterhaltung des Selbsterneuerungspotentials der HSCs [87]. Die höchste Konzentration von PU.1 ist in der myeloiden Differenzierung nachweisbar, dort überwiegend in reifenden Makrophagen und Monozyten [88]. Hier kontrolliert PU.1 die Expression myeloider Gene, die an der Entwicklung und Differenzierung der Makrophagen/ Monozyten beteiligt sind, z. B. des CD11b- Rezeptor- Gens [89] und der Gene für den M- CSF- Rezeptor [76] und den GM- CSF- Rezeptor [90]. Makrophagen- ebenso wie verwandte Zellen (Mikroglia, Osteoklasten und Granulozyten) entwickeln sich in PU.1- knock- out- Mutanten nicht [91]. PU.1- knock- out- Mäuse sterben noch

vor der Geburt oder in der Neonatalperiode an Infektionen bzw. Sepsis und weisen ein Fehlen aller myeloiden und lymphoiden Zellen auf [92].

In der granulozytären Linie ist die PU.1- Expression gering- hier ist der vorherrschende TF CEBP α , der die granulozytäre Entwicklung steuert. Moderate Mengen an PU.1 werden in der B- Zell- Entwicklung exprimiert; in der T- Zell- Reihe fehlt die PU.1- Expression. Entlang der erythrozytären und megakaryozytären Linie kommt es zum Abfall der Konzentration von PU.1 im Laufe der Differenzierung. In reifen Erythrozyten ist keine PU.1 Expression nachweisbar [91] (Abbildung 3)

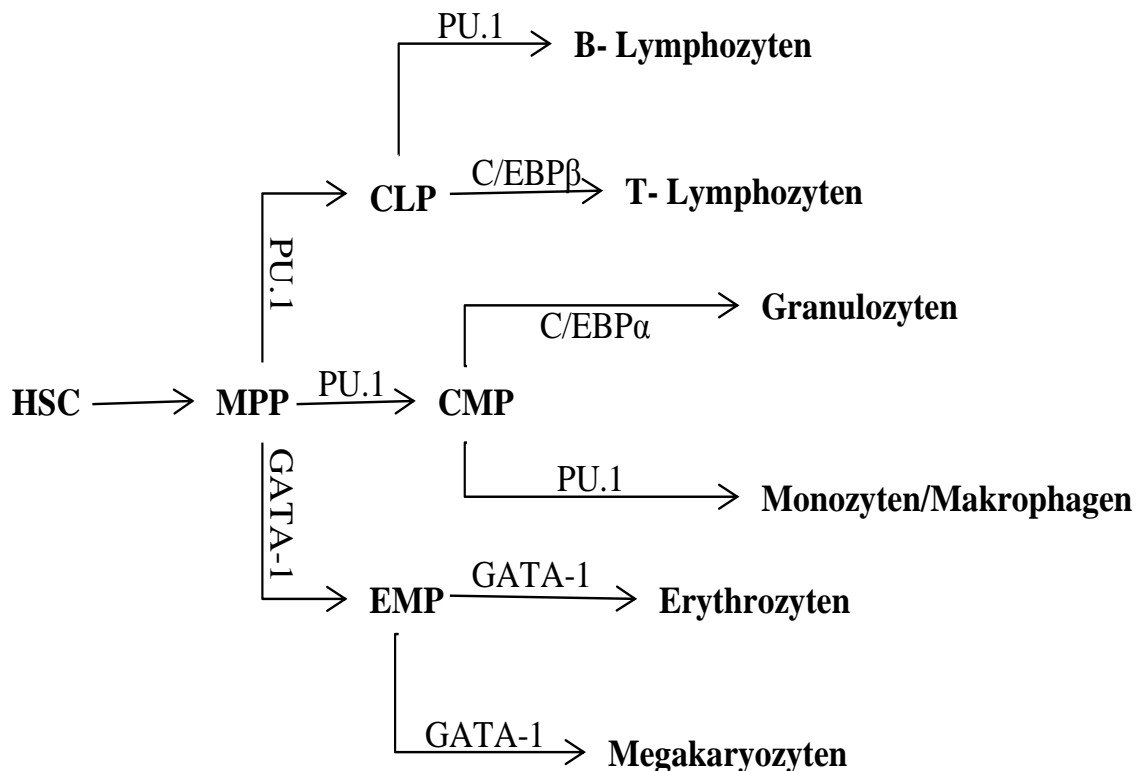


Abbildung 3: Expression verschiedener TF während der Hämatopoese

In der Hämatopoese werden verschiedenen Entwicklungsstufen und Zelllinien durch die Expression unterschiedlicher TF reguliert. Während die myeloide und lymphoide Differenzierung hauptsächlich durch PU.1 beeinflusst wird, steht die erythroide und megakaryozytäre Entwicklung unter der Kontrolle von GATA-1 und die der Granulozyten unter dem Einfluss von C/EBP β .

HSC- hämatopoetische Stammzelle, MPP- myeloide Progenitorzelle, CLP- lymphoide Progenitorzelle, CMP- myeloide Progenitorzelle, EMP- erythroide/ megakaryozytäre Progenitorzelle

Der wichtigste Gegenspieler von PU.1 ist GATA-1. Die Expression und Funktion von PU.1 in der myeloiden Differenzierung kann durch GATA-1 inhibiert werden. Die GATA-1- Expression ist mit der Ausbildung eines myeloiden Phänotyps nicht vereinbar. Die Expression von PU.1 führt zu GATA-1-Respression und umgekehrt, d. h. die Zellen, die GATA-1 exprimieren, bilden kein PU.1, z. B. erythroide Vorläuferzellen [93] (Abbildung 3).

1.6 Ski in der Hämatopoese und Leukämogenese

Das *SKI- Gen* (Chromosom 1p36.3) kodiert für das Kernprotein Ski, das ubiquitär in adulten und embryonalen Geweben exprimiert wird [94]. Die Funktionen von Ski sind in der Literatur zahlreich beschrieben. In der Embryogenese reguliert Ski die Zelldifferenzierung, besonders in neuronalen Geweben und der Skelettmuskulatur. In adulten Geweben ist Ski in Prozesse der Proliferation, Differenzierung und Apoptose involviert. Ski ist damit an der Karzinogenese und an terminalen Differenzierungsprozessen beteiligt, sodass es sowohl als Proto- Onkogen als auch Tumorsuppressorgen wirken kann. Diese gegensätzlichen Funktionen werden durch die Anwesenheit verschiedener Bindungspartner reguliert [95]. In seiner Funktion als Onkogen ist Ski in verschiedenen Malignomen erhöht exprimiert, z.B. in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus [96], in malignen Melanomen [97] und in AMLs [60, 61]. Dabei scheint die Inhibition von TGF β eine bedeutende Rolle zu spielen [100]. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass *SKI*-defiziente heterozygote Mäuse hämatologische maligne Erkrankungen (T- und B- Zell- Lymphome) entwickeln [101]. Möglicherweise ist die tumorsupprimierende Aktivität von Ski auf dessen Interaktion mit anderen Tumorsuppressoren wie Rb (Retinoblastom) zurückzuführen, welches eine Zellzykluskontrolle vermittelt. Weiterhin konnte in einigen Fällen von CLL gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von Ski mit einem besseren Outcome assoziiert ist [102]. Ski scheint somit inverse Funktionen auszuüben, auch in hämatopoetischen Zellen. So wurde Ski als Repressor der Differenzierung in der myeloiden Reihe beschrieben. Über eine Interaktion von

Ski mit dem TF PU.1 kommt es zu einem Differenzierungsblock in myeloiden Progenitorzellen. Weiterhin hemmt Ski die Expression des M-CSF-R, dessen Promotor PU.1-abhängig ist, indem es die HDAC3 (Histon-Deacetylase) rekrutiert. HDAC3 deacetyliert Lysin am Histonende, wodurch die DNA eine Umwandlung in inaktives Heterochromatin vollzieht. Aufgrund dieser Strukturveränderung kann der TF PU.1 nicht mehr an der DNA binden und wird somit in seiner Funktion reprimiert [103]. Außerdem interagiert Ski mit GATA1, dem Gegenspieler von PU.1, wobei die Art der Bindung in beiden Fällen verschieden [104], der Effekt auf zellulärer Ebene jedoch ähnlich ist. Der Ski-vermittelte Differenzierungsblock führt im Fall von PU.1 zur AML, im Fall von GATA1 zur Erythroleukämie.

2 Zielstellung

Am Anfang dieser Arbeit stand die Untersuchung der Wirkung von miRNAs innerhalb der Myelopoese. Dabei rückte die miR-21 nach Durchführung einer Literaturrecherche und MicroArray Analyse in den Focus der Betrachtungen. Diese miRNA war bisher fast ausschließlich als onkogen bekannt. Der MicroArray zeigte jedoch eine deutliche Hochregulation der miR-21 innerhalb der myeloiden Differenzierung. Dies ließ vermuten, dass die miR-21 auch einen differenzierungsfördernden Faktor darstellt. Über die myeloiden Signalwege, in die die miR-21 eingebunden ist, waren zum Zeitpunkt der Experimente noch keine Daten publiziert. Ziel dieser Arbeit war es daher, einen Regulator bzw. ein putatives Ziel der miR-21 innerhalb der myeloiden Differenzierung zu identifizieren. Das komplette Verständnis der Steuerung der myeloiden Differenzierung durch miRNAs ist ein wichtiger Schritt für das Verständnis der Leukämieentstehung und folglich essenziell für die Entwicklung von Therapieansätzen, bei denen gezielt in das regulatorische Netzwerk eingegriffen wird.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Reagenzien

Accustain® Giemsa Stain	Sigma- Aldrich
Accustain® May- Grünwald Stain	Sigma- Aldrich
Acrylamid Mix 30% Rotiphorese® Gel 30	Roth®
Agar- Agar	Roth®
Agarose GTQ	Roth®
Ammoniumpersulfat APS	Sigma®
Ammoniumthiocyanat	Fluka
Ampicillin	Sigma®
Aqua dest.	Braun
Bio- Rad Protein Assay	Bio- Rad Laboratories GmbH
Corall Load PCR Buffer 10x	Qiagen
Deoxycholic Acid	Sigma®
Dimethylsulfoxid DMSO	Roth®
6x DNA Loading Buffer	Fermentas
dNTP Mix 100mM	Applied Biosystems
dNTP Mix 10mM	Fermentas
DTT Dithiothreitol	Invitrogen
Dulbecco`s PBS (10x)	PAA Laboratories GmbH
EDTA	Promega
Essigsäure	Roth®
Ethanol absolut puriss.	Riedel- de Haën®
1% Ethidiumbromid	Roth®
FBS fetales bovines Serum	PAA
Glycerol	Roth®

Funktionelle und regulatorische Analysen zur miR-21 im myeloiden
Differenzierungsmodell U937

Guanidinthiocyanat	Sigma®
Hefeextrakt	Roth®
Igepal CA- 630	Sigma- Aldrich
1Kb DNA Ladder	Promega
Lipofectamine™ LTX	Invitrogen
Luminol	Roth®
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x)	Fermentas
Methanol	Sigma- Aldrich
MgCl ₂	Qiagen
Milchpulver Blotting Grade	Roth®
Natriumchlorid NaCl	Isocommerz/ Chemapol
Natriumhydroxid NaOH	Chemapol
Oligo (dT) ₁₈ Primer 0,5µg/µl	Fermentas
Opti-mem Medium	Sigma®
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas
Para- Hydroxycoumarinsäure	Sigma®
Phenol	Roth®
Phenylmethanesulfonyl fluoride Solution	Fluka
Plus™ Reagenz	Invitrogen
PMA (Phorbol myristate acetate)	Sigma- Aldrich
Ponceau S solution	Sigma®
Protease Inhibitor Cocktail PIC	Roth®
2-Propanol	Sigma®
PSG Penicillin Streptomycin Glutamin (100x)	Invitrogen
Q Solution	Qiagen
5x Reaction Buffer for M-MuL V RT	Fermentas
RevertAid H Minus M- MuLVReverse Transkriptase	Fermentas
RiboLock RNase Inhibitor	Fermentas
Rotiphorese® 10x SDS- Page	Roth®
RPMI 1640 Fertigmedium	PAA
Salzsäure Rotipuran® >25%	Roth®
SDS Page 1x	Roth®

Funktionelle und regulatorische Analysen zur miR-21 im myeloiden Differenzierungsmodell U937

SDS Ultra Pure	Roth®
Sodium acetate	Sigma®
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
TAQ- Polymerase	Qiagen
TEMED	Bio-Rad
Trichlormethan/Chloroform Rotipuran®≥99%	Roth®
Tris Ultra Qualität	Roth®
Trizma Base Solution 1,5M	Sigma
Trypton	Roth®
Tween 20	Bio- Rad Laboratories GmbH
Wasserstoffperoxid 30%	Sigma®

3.1.2 Kits

Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit C	Lonza
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
miRXplore™ Microarray Kit	Miltenyi Biotec
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit (25)	Qiagen

3.1.3 Antikörper für Western Blot und FACS- Analyse

GAPDH antibody sc-25778	Santa Cruz
PU.1 (Spi-1)(T-21)X sc-352X	Santa Cruz
Goat anti- rabbit IgG- HRP sc-2004	Santa Cruz

PE Mouse Anti- Human CD11b	BD Biosciences
PE Mouse IgG1 κ Isotype Control	BD Biosciences

3.1.4 Plasmide und LNA

pcDNA 3.1 sowie pcDNA 3.1- PU.1	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe D. G. Tenen, Harvard Medical School, Boston, MA, USA
pcDNA 6.2 Vector sowie pcDNA 6.2- miR-21	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe G. Behre, MLU Halle- Wittenberg, Medizinische Fakultät, Abteilung für Innere Medizin IV, Hämatologie/ Onkologie, Halle, Deutschland
LNA miRCURY™ Knockdown 199002-04 Scramble miR Control	Exiqon
LNA miRCURY™ Knockdown 138102-04 hsa-miR-21	Exiqon

3.1.5 Primer für PCR (mRNA, microRNA)

Primer	Sequenz	Zyklen	Annealing-Temperatur
GAPDH	for 5`-accacagtccatgccatcac-3`	30	60°C
	rev 5`-tccaccaccctgttgctgta-3`		
M-CSF-R	for 5`-gtggctgtgaagatgctgaa-3`	25	51°C
	rev 5`-ccttccttcgcagaaagttg-3`		
PU.1	for 5`-ccagctcagagaggag-3`	30	60°C
	rev 5`-caggtccaacactggt-3`		
Ski	for 5`-ttgacaaccttccttc-3`	40	51°C
	rev 5`-tgggggtaaaaagacacgag-3`		
TaqMan® MicroRNA Assay hsa-miR-21 (RT und Realtime)		Applied Biosystems	
TaqMan® MicroRNA Assay RNU6B (RT und Realtime)		Applied Biosystems	

3.1.6 Bakterien und Zelllinien

E.coli DH5α	Invitrogen
U937- Zellen	DSMZ

3.1.7 Pufferlösungen und Kulturmedien

Blotting Puffer	800ml 1x SDS Page, 200ml Methanol
ECL- Lösung	2ml Solution A (200ml 0,1 M TRIS, 50 mg Luminol) 200µl Solution B (10ml DMSO, 11 mg para-Hydroxycoumarinsäure) 0,6µl Wasserstoffperoxid
Ripa- Puffer	100mM NaCl 50mM Tris 0,5% Desoxycholat 0,5% SDS 0,5% Igepal
LB- Agar	LB- Medium + 1,5% Agar; autoklavieren Ampicillin 50 mg/ml
LB- Medium	10g Trypton 5g Hefeextrakt 5g NaCl mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren
PBS-T	1xPBS 0,1% Tween 20
RPMI- Medium	450ml RPMI- Fertigmedium 10% FBS 1% PSG
1x TAE	40mM Tris 20mM Essigsäure 1mM EDTA pH 8,3 einstellen
TRIS 0,5 M (pH 6,8)	1000ml Aqua dest. 61g Trizma Base mit HCL auf pH 6,8 angleichen
TRIS 1,5M (pH 8,8)	700ml Aqua dest. 181,5 g Trizma Base mit HCL auf pH 8,8 einstellen

Funktionelle und regulatorische Analysen zur miR-21 im myeloiden Differenzierungsmodell U937

Trizol	9,5g Guanidinthiocyanat 3,1g Ammoniumthiocyanat 3,5ml 3M NaAc pH 5,0 5g Glycerol 48ml 38% Phenol auf 100ml mit Aqua dest. auffüllen
--------	--

3.1.8 Verbrauchsmaterial

½ CC Tuberculin Syringe Einmalspritze	Becton Dickinson and Company
1,5 ml Polypropylen Treff Clear Microtubes	Treff Lab
24cm Zellschaber	TPP
6-Well-Plate/ 12-Well-Plate	TPP
Amersham Hyperfilm	GE Healthcare
BD Falcon 5ml Polystyrene Round- Bottom T	BD Biosciences
Falcon PP- Test Tubes 15ml	Greiner Bio- One Cellstar
Falcon PP- Test Tubes 50ml	Greiner Bio- One Cellstar
Filterkarten für Zytokammern	Hettich
Gel- Blotting- Papier 580x580mm, 1,2mm	Whatman
Handschuhe Gentle Skin® sensitive	Meditrade
Nitrozellulose Membran	G. Kisker GbR
Objektträger Menzel- Gläser® 76x26mm	Menzel GmbH + Co. KG
Pasteurpipetten	Hirschmann® Laborgeräte
PCR- Einzeltubes mit Deckel flach 0,2ml	BD Bioscience
Pipette, mit Spitze, 5ml/10ml/25ml	Greiner Bio- One GmbH
Pipettenspitzen 10µl/200µl/1000µl	Star Lab GmbH
Proteinpipettenspitzen MultiFlex Round Tips 1-200µl	BioSience
Rotiprotect®- Nitril puderfrei Handschuhe	Roth®
Wägeschiffchen-80x80x20mm/ 40x40x7mm	BD Bioscience
Zählkammer	Neubauer
Zellkulturflaschen	TPP®

3.1.9 Geräte

Abzug	Nuaire Biological Safety Cabinet Hera Safe
Apparatur für Western Blot	Bio-Rad
Axiovert 25 und Axioacam	Zeiss
BioDoc Transilluminator	Biometra®
Biometria® T Gradient Thermoblock	Biometra®
Biometria® WT 16 Wippe	Biometra®
Biophotometer	Eppendorf
BioSpec-1601E	Shimadzu
Dampfsterilisator Varioklav 300/400/500 EP-Z	H+P Labortechnik GmbH
Entwicklermaschine HyperProcessor	Amersham Bioscience
FACS Calibur	Becton Dickinson
Färbewannen/ Einsatz für Objektträger	Hettich
HyperProcessor Entwicklermaschine	Amersham Biosciences
Microwelle Continent MW 800	Continent
pH- Meter seven easy	Mettler Toledo
Pipette 2µl/10µl/100µl/200µl/1000µl	Rainin
Rotor-Gene RG-3000 PCR- Maschine	Corbett Research
Schüttler TH 30	Edmund Bühler
SpeedVac Concentrator 5301	Eppendorf
Stromversorgungsgerät PowerPac 3000	Bio-Rad
Sub- Cell® GT Apparatur für Agarose Gelelektrophorese	Bio-Rad
Thermomixer 5436	Eppendorf
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad
Waage	Sartorius MC1
Zentrifuge Biofuge Fresco	Haereus
Zentrifuge Multifuge 1 S-R	Haereus
Zentrifuge Primo R	Haereus
Zentrifuge Universal 30 RF	Hettich
Zytosystem	Hettich

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 RNA- Präparation mit Trizol

Nachdem die Zellen von der Platte abgenommen wurden- PMA- stimulierte U937- Zellen werden adhären, sodass sie mit Hilfe eines Zellschabers von der Platte gelöst werden müssen- werden sie bei 4°C und 1000rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 1 ml Trizol resuspendiert. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform und kurzem Schütteln inkubiert der Reaktionsansatz 5 min bei Raumtemperatur. Nach 15minütigem Zentrifugieren bei 4°C und 13000 rpm wird die obere Phase abgenommen und in ein RNase freies RG pipettiert. Nachdem 700µl Isopropanol hinzugefügt wurden, bleibt der Ansatz 10 min bei Raumtemperatur stehen und wird anschließend 10 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wird das Pellet in 1 ml 70% Ethanol gewaschen und danach 10 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Nach dem erneuten Verwerfen des Überstandes wird das Pellet getrocknet, in 20 µl DEPC- Wasser resuspendiert und für 20 min bei -20°C eingefroren.

3.2.1.2 RNA- Messung

Nach dem Auftauen des Ansatzes wird die Konzentration der RNA am Biophotometer gemessen. Hierzu wird eine 1:100 Verdünnung hergestellt. Für die Messung wird das Programm *RNA- Dilution 1:100* verwendet.

3.2.1.3 Reverse Transkription der MicroRNAs

Nach dem Angleichen der Konzentrationen auf 20 ng/µl wird das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems verwendet-

entsprechend dem Handbuch (Tabelle 4). Die Reaktion findet in einem Biometria® T Gradient Thermoblock statt (Tabelle 5).

Tabelle 4: Zusammensetzung des Reverse Transkriptions- Ansatzes der MicroRNAs (Angaben pro Probe)

Komponenten	Volumen
100mM dNTPs	0,15µl
Multi Scribe Reverse Transkriptase 50U/µl	1µl
10x RT Puffer	1,5µl
RNAse Inhibitor	0,2µl
Aqua dest.	4,15µl
RNA	5µl
Primer (U6, miR-21)	3µl
Endvolumen	15µl

Tabelle 5: Zyklen für die Reverse Transkription der MicroRNAs

Schritte	Temperatur	Zeit
Initiation	16°C	30 min
Elongation	42°C	30 min
Termination	85°C	5 min
Abkühlung	4°C	Pause

3.2.1.4 Realtime- PCR für MicroRNAs

Die Komponenten werden nach Tabelle 6 einpipettiert. Für jede Probe wird sowohl eine dreifache Wiederholung als auch eine U6- Kontrolle hergestellt. Die Amplifikation der cDNA findet in einem Rotor-Gene 3000 Thermocycler statt. Dieser misst nach jedem Zyklus die Extinktion der Fluoreszenz (über die Primer) der amplifizierten cDNA. Die Auswertung der Daten erfolgt nach der $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ - Methode [105].

Formel: $\Delta(\text{Ct}) = \text{Ct}_{\text{Probe}} - \text{Ct}_{\text{Normalisierungskontrolle}}$

$\Delta(\Delta\text{Ct}) = \Delta(\text{Ct})_{\text{Probe}} - \Delta(\text{Ct})_{\text{Kontrolle}}$

$2^{-\Delta(\Delta\text{Ct})} = \text{Verhältnis der Proben zu verschiedenen Zeitpunkten}$

Tabelle 6: Zusammensetzung des Ansatzes für die quantitative Realtime- PCR der MicroRNAs (Angaben pro Probe)

Komponenten	Volumen
TaqMan® Universal PCR Master Mix	10µl
Aqua dest.	7,67µl
cDNA	1,33µl
TaqMan Primer (hsa-miR-21, RNU6B)	1µl
Endvolumen	20µl

3.2.1.5 Reverse Transkription für mRNA

Die Herstellung der cDNA erfolgte mittels Reverser Transkription unter Verwendung von 1µg RNA, 4µl 5x Reaktionspuffer, 2µl 10mM dNTP Mix, 1µl Oligo (dT)₁₈ Primer 0,5µg/µl, 1µl RevertAid H Minus M- MuIV Reverse Transkriptase und 0,5 µl RNAsin. Es wurde auf 20µl mit Aqua dest. aufgefüllt. Die Reaktion wurde bei 42°C für 1h durchgeführt- die Beendigung der Reaktion mit Enzyminaktivierung bei 70°C für 10 min fand ebenfalls statt.

3.2.1.6 Realtime- PCR für mRNA

Die Realtime- PCR wird mit dem QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit von Qiagen entsprechend der Empfehlungen der Herstellers durchgeführt (Tabelle 7). Die Amplifikation der cDNA erfolgt mittels eines Rotor- Gene Thermocyclers in 40 Zyklen. Die Annealing- Temperatur beträgt bei PU.1 und GAPDH 60°C, bei Ski 51°C. Die Auswertung der Daten erfolgt nach der $2^{-\Delta(\Delta\text{Ct})}$ - Methode [105].

Tabelle 7: Mischungsverhältnis für die Realtime- PCR für mRNAs (Angaben pro Probe)

Komponenten	Volumen
2x QuantiTect® SYBR® Green PCR Master Mix	10µl
Primer (forward)	1µl
Primer (reverse)	1µl
cDNA	1µl
Aqua dest.	7µl
Endvolumen	20µl

3.2.1.7 Semiquantitative PCR für mRNA

Es werden 2µl Puffer 10xCl, 4µl Q Solution, 0,5µl MgCl₂, 1µl dNTP 10nM, 1µl Primer forward und 1µl Primer reverse (PU.1, M-CSF-R und GAPDH), 1µl Taq-Polymerase und 1µl cDNA je Probe einpipettiert und auf 20µl mit Aqua dest. aufgefüllt. Für die Amplifikationsreaktion wird ein Biometria® T Gradient Thermoblock verwendet- Programm laut Protokoll (Tabelle 8). Die Schritte 3.-5. werden 30x für PU.1 und GAPDH bzw. 25x für den M- CSF- Rezeptor wiederholt- entsprechend der Anzahl der von den Primern benötigten Zyklen. Danach findet die Agarose- Gelelektrophorese statt.

Tabelle 8: PCR- Programm für mRNA (PU.1, M- CSF- R und GAPDH)

Schritte	Temperatur in °C	Zeit
1. Schritt: Deckel vorheizen	99°C	Pause
2. Schritt: Initiale Denaturierung	95°C	5 min
3. Schritt: Denaturierung	95°C	30s
4. Schritt: Annealing	60°C für GAPDH 60°C für PU.1 51°C für M- CSF-R	30s
5. Schritt: Elongation	72°C	30s
6. Schritt: Finale Elongation	72°C	5 min
7. Schritt: Kühlen	4°C	Pause

3.2.1.8 Agarose- Gelelektrophorese

Der 1x TAE- Puffer wird für die Agarose- Gele und als Laufpuffer verwendet. Die 1,5% Agarose- Gel- Lösung (3g Agarose auf 200ml 1x TAE) wird in einer Microwelle aufgekocht, bis die Agarose vollständig gelöst ist. Nach der Abkühlung auf ca. 60°C wird 1:10000 Ethidiumbromid hinzu gegeben- anschließend wird das flüssige Gel in einen Gelträger gegossen und die Kämme eingesteckt. Nach der Auspolymerisation und der Überschichtung mit 1x TAE Puffer werden die cDNA- Proben mit 5µl 6x Ladepuffer versetzt. Es werden 15µl je Probe und 6µl 1Kb DNA Ladder geladen. Anschließend läuft die Elektrophorese 30 min bei 70V. Die mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden lassen sich im Transilluminator unter UV-Licht (302 nm) identifizieren. Das Gel kann dann unter UV- Licht fotografiert und mit dem Computerprogramm BioDoc Analyse ausgewertet werden.

3.2.1.9 MicroArray

Zur Probengewinnung werden 1×10^6 U937- Zellen mit 10nM PMA/ Ethanol stimuliert und nach 24h abgenommen. Die Präparation der Total- RNA erfolgt mit Trizol. Die RNA- Proben werden mit den Fluoreszenzfarbstoffen Hy3TM und Hy5TM markiert. Die Hybridisierungsreaktion findet in der a- HybTM Hybridisierungsstation statt. Der MicroArray erfolgt mit dem miRXploreTM Microarray Kit von Miltenyi Biotec entsprechend der Anleitung. Es werden 4µg RNA verwendet. Abschließend werden die Chips eingescannt und grafisch sowie statistisch mit der Gene Pix 6.0 Software (Axon) ausgewertet.

3.2.1.10 Transformation von E.coli mit Plasmiden

Die Plasmide wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe D. G. Tenen, Harvard Medical School, Boston, MA, USA (pcDNA 3.1 und pcDNA 3.1- PU.1) sowie von der Arbeitsgruppe G. Behre, MLU Halle- Wittenberg, Medizinische Fakultät, Abteilung für Innere Medizin IV, Hämatologie/ Onkologie, Halle, Deutschland (pcDNA 6.2 und pcDNA 6.2- miR-

21). 100µl der kompetenten E.coli- Bakterien werden mit 1ng der zu transfizierenden Plasmid- DNA gemischt und 30min auf Eis gestellt. Danach wird für 60 s ein Hitzeschock bei 42°C durchgeführt. Nach der Zugabe von 1ml LB- Medium wird der Ansatz 60 min bei 37°C inkubiert. Die Bakterien werden dann auf LB- Agar- Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurde eine einzelne Kolonie gepickt und in 1ml LB- Medium bei 37°C über Nacht inkubiert. Für die Maxi- Präp wurde das QIAGEN® Plasmid Maxi Kit (25) verwendet sowie das zugehörige Handbuch.

3.2.1.11 Transiente Transfektion mittels Elektroporation

Die transiente Transfektion der U937- Zellen mit Plasmiden erfolgt über Elektroporation mit dem Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit C von Lonza gemäß der Anweisung des Herstellers. Transfiziert werden pro Ansatz 1×10^6 Zellen mit je 2µg Plasmid (pcDNA 3.1 und pcDNA 3.1- PU.1 sowie pcDNA 6.2 und pcDNA 6.2- miR-21). Für die Transfektion wird das Programm W-01 verwendet.

3.2.1.12 Transiente Transfektion mit Lipofectamin

Die transiente Transfektion der U937- Zellen mit LNA erfolgt mit Lipofectamin. 8µl der zu transfizierenden LNA und 8µl Plus Reagenz werden einpipettiert und 20 min bei RT inkubiert. Gleichzeitig werden 12µl Lipofectamin und 125µl OPTI-MEM gemischt und ebenfalls 20 min bei RT inkubiert. 1×10^6 Zellen werden mit OPTI-MEM ausplattiert und anschließend mit beiden Ansätzen überschichtet. Die Transfektionsreaktion findet über 4h bei 37°C im Inkubator statt.

3.2.2 Proteinchemische Methoden

3.2.2.1 Proteinisolierung

Nach dem Zählen der Zellen und der Entnahme von 1mio. Zellen werden diese 5 min bei 1000rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet zur Lagerung bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen auf Eis wird 100µl Ripa- Puffer auf jede Probe pipettiert. Die Proben werden mit einer Insulinkanüle zerschert und inkubieren dann 60 min auf Eis.

3.2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinmenge wird mit dem BioSpec-1601E gemessen, wobei das Programm *protein measurement- Methode Bradford 595nm* benutzt wird. In ein RG werden 798µl Aqua dest., 2µl Probe und 200µl BioRad Protein Assay einpipettiert. Außerdem wird eine Leerkontrolle hergestellt, um das Gerät zu kalibrieren. Hierzu werden 800µl Aqua dest. und 200µl BioRad Protein Assay einpipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 5- 10 min wird die Konzentration gemessen. Die Angleichung der Proteinmengen erfolgt mit Ripa auf 100µg Totalprotein. Nach der Zugabe des Loading Buffer werden die Proteine in den Proben bei 95°C 15 min lang im Thermomixer denaturiert.

3.2.2.3 SDS- PAGE

Nach dem Zusammenbau der Apparatur wird für 10ml 12% Trenngel 3,3ml Aqua dest., 4ml 30% Acrylamid Mix, 2,5ml 1,5M Tris (pH 8,8), 100µl 10% SDS, 100µl 10% APS und 4µl TEMED in ein 15ml Falcon pipettiert. Das flüssige Gel wird in die Apparatur eingefüllt und Isopropanol zur Begradigung der Oberfläche verwendet. Nach der Auspolymerisation wird das Isopropanol abgegossen. Für 5ml 5% Sammelgel wird 2,87ml Aqua dest., 1,25ml 0,5M Tris (pH 6,8), 50µl 10% SDS, 832µl 30% Acrylamid Mix, 25µl 10% APS und 6µl TEMED

einpipettiert. Das Sammelgel wird auf das feste Trenngel pipettiert, die Kämme eingesteckt und das Gel polymerisiert aus. Nach dem Umbau der Apparatur wird 1x SDS- Page in die Kammern gefüllt und 20µl der Proben sowie 6µl der PageRuler Prestained Protein Ladder in jeden Slot geladen. Dazu werden Proteinpipettenspitzen verwendet. Die Proteinauftrennung erfolgt bei 200V 50 min.

3.2.2.4 Western Blot

Für die Proteindetektion werden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine nach dem Semi-Dry-Verfahren (Kyhse-Andersen) auf Nitrocellulose-Membranen transferiert. Es wird eine Stromstärke von 150 mA bei variabler Spannung für 50 min angelegt.

3.2.2.5 Proteindetektion

Der Proteintransfer wird mittels Ponceau S- Solution überprüft. Nach der Entfärbung der Membran durch mehrmaliges Spülen mit Aqua dest. erfolgt die Absättigung unspezifischer Bindestellen der Oberfläche in 5% Milchlösung für 1h. Die Verdünnung des primären Antikörpers findet mit 5% Milchlösung statt. (PU.1 1:10000, GAPDH 1:10000). Die Bindung der primären Antikörper erfolgt über Nacht bei 4°C.

Vor der Zugabe der sekundären Antikörper wird die Membran 2x 5 min und 2x 10 min mit PBS-T gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Anti-rabbit-IgG HRP) wird in PBST 1:10000 verdünnt und dann 1h bei RT inkubiert. Nach 3x 10 minütigem Waschen der Nitrocellulose-Membran in PBS-T wird diese für 1 min mit der ECL- Lösung inkubiert und dann die chemiluminometrische Detektion durchgeführt.

3.2.3 Biophysikalische Methoden

3.2.3.1 Durchflusszytometrie

Zur Messung der Oberflächenmarker in PMA/Ethanol stimulierten U937- Zellen werden über drei Tage je 100000 lebende Zellen entnommen. Nach dem Zentrifugieren, Absaugen des Überstandes und erneutem Lösen in 100µl PBS werden die Zellen mit PE- konjugierten Antikörpern 30 min inkubiert. Dazu werden PE Mouse Anti- Human CD11b und PE Mouse IgG1 κ Isotype Control verwendet. Nach einmaligem Waschen in 3ml PBS , Zentrifugation (RT, 1500rpm, 5 min) und Absaugen des Überstandes werden die Zellen in 250µl PBS gelöst und mit Hilfe eines FACS Calibur die verschiedenen Populationen (Cd11 positive Zellen, Cd11 negative Zellen) gezählt. Zur Auswertung und Analyse dient das Programm Cell Quest.

3.2.3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um die Transfektionseffizienz von U937- Zellen mit einem GFP- gekoppelten Plasmid (pcDNA 6.2 Vector/ pcDNA 6.2 miR-21) zu prüfen. Nach Anregung der Zellen mit UV- Licht bzw. blauem Licht fluoreszieren die Zellen, die das Plasmid tragen, grün. Mikroskopiert wurde mit dem Axio Vert 25. Die Aufnahmen wurden mit der Axio Cam bei 100facher Vergrößerung aufgenommen.

3.2.3.3 May- Grünwald- Färbung

Nach der Entnahme von 10000 mit Ethanol stimulierten und 50000 mit PMA stimulierten Zellen über einen Zeitraum von drei Tagen, der Zentrifugation (5 min, RT, 100rpm) und der Abnahme des Überstandes wird das Zellpellet in 100µl 1x PBS gelöst. Die Zellsuspension wird auf den im Zytosystem befindlichen, mit Filterkarten bedeckten Objektträger pipettiert und 5 min bei

1000 rpm, RT zentrifugiert. Nach der Entfernung der Filterkarten wird die Zentrifugation wiederholt. Die Objektträger werden in den Einsatz eingespannt. Der Einsatz wird für 5min in die Färbewanne mit May- Grünwald getaucht, danach zum Waschen in die Wanne mit 1x PBS. Nach der Herstellung der 1:15 verdünnten Giemsalösung wird der Einsatz für 20 min eingetaucht und dann einmal in 1x PBS und einmal in Aqua dest. gewaschen. Nach der Trocknung werden die Präparate mit dem Axio Vert 25 mikroskopiert und mit der Axio Cam fotografiert. Die Bildbearbeitung erfolgt mit dem Programm Axio Vision.

3.2.4 Zellkultur

Verwendung finden U937- Zellen- hierbei handelt es sich um eine humane histiozytische Lymphom- Zelllinie. Die Zellen werden mit einer Dichte von 300000/ml in RPMI- Medium ausplattiert und in Begasungsbrutschränken bei 37 °C, 96% relativer Feuchte und 5% CO₂ inkubiert.

3.2.5 Statistik

Um festzustellen, wie wahrscheinlich Unterschiede zwischen Messwerten durch Zufall aufgetreten sind, wird der t- Test angewendet. Signifikant sind Werte dann, wenn die Wahrscheinlichkeit, dass die Differenzen der Meß- bzw. Mittelwerte zufällig entstanden sind, gering ist. Signifikante Werte lassen einen kausalen Zusammenhang wahrscheinlich erscheinen. Für die statistische Auswertung sämtlicher Ergebnisse wurde der student-t-Test für unabhängige Stichproben verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 PMA- induzierte myeloide Differenzierung von U937- Zellen

U937- Zellen, die mit PMA stimuliert werden, gelten als gängiges *in vitro*-Modell für die monozytäre Differenzierung [22–25]. Undifferenzierte Blasten der Zelllinie U937 differenzieren unter Stimulation mit dem Proteinkinase C-Aktivatoren PMA zu Monozyten bzw. Makrophagen. Dieses System wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um die Regulation, Funktion und Expression der microRNAs in der myeloiden Differenzierung zu untersuchen. Zur Überprüfung der myeloiden Differenzierung wurden die PMA- stimulierten U937- Zellen auf die Expression verschiedener Marker hin untersucht. Die Analyse der Differenzierung erfolgt mittels Durchflusszytometrie, semiquantitativer PCR und morphologisch über die May- Grünwald- Färbung zu je drei Zeitpunkten (24h, 48h und 72h). Das verwendete PMA ist in Ethanol gelöst, sodass Ethanol als Kontrollagens diente. Da bisher kein Oberflächenmarker bekannt ist, der ausschließlich auf Monozyten exprimiert wird, wurden Kombinationen von Markern verwendet, um die Monozyten eindeutig zu identifizieren. Monozyten weisen eine typische Morphologie auf, sodass man sie phänotypisch von anderen Zellpopulationen unterscheiden kann. Monozyten sind die größten im Blut zirkulierenden Zellen (Durchmesser 12- 25µm). Sie besitzen einen breiten Zytoplasmasaum, der feine Granula (Lysosomen) enthält. Der exzentrische Kern ist polymorph- er kann sowohl kugel- als auch nierenförmig erscheinen. PMA- stimulierte U937- Zellen zeigen in der May- Grünwald- Färbung im Vergleich zur Ethanolkontrolle bereits nach 24h morphologische Veränderungen. Die Zellen zeigen eine Volumenzunahme. Das Erscheinungsbild ist polymorph, die Kern- Plasma- Relation nimmt ab, der Zytoplasmasaum wird breiter, der Zellkern steht exzentrisch, die Vakuolarisierung und Granularisierung des Plasmas nimmt stark zu, die Zellen

werden adhären. Nach 48h bzw. 72h nimmt der Anteil der morphologisch veränderten Zellen zu. Die Vakuolisierung des Zytoplasmas ist nach 72h am deutlichsten ausgeprägt (Abbildung 4A). Diese morphologischen Merkmale korrelieren mit dem Phänotyp der Monozyten.

Mit der Durchflusszytometrie (FACS- Analyse) wurden die U937- Zellen auf die Expression von CD11b (Integrin α_M) auf der Oberfläche hin untersucht. CD11b ist ein Glykoprotein, dass an der Oberfläche verschiedener myeloider Zellen (Granulozyten, Monozyten, Makrophagen) und NK- Zellen (natürliche Killerzellen) exprimiert wird. CD11b vermittelt Zell- Zelladhäsion, Phagozytose und Degranulierung [66, 67]. Auf undifferenzierten U937- Zellen wird es nicht exprimiert. Das Ergebnis der Durchflusszytometrie zeigt eine starke Zunahme von CD11b auf den PMA stimulierten U937- Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Ethanol- behandelte U937- Zellen). 24h nach Stimulation mit 10nM PMA exprimieren 25,58% der Zellen CD11b, nach 48h bereits 74,23% und nach 72h 85, 83% im Vergleich zur Kontrolle, in der die Expression von CD11b zu allen drei Zeitpunkten unter 1% liegt (Abbildung 4B).

Um spezifischere Aussagen hinsichtlich der Art der myeloiden Zellen zu treffen, wurde ein weiterer Differenzierungsmarker, M- CSF- R, verwendet. M- CSF kontrolliert die Reifung mononukleärer Phagozyten (Monozyten und Makrophagen) aus HSCs sowie Überleben und Wachstum der monozytären Zellen [109]. Auf molekularer Ebene werden die Effekte von M- CSF auf die Aktivierung des M- CSF- Rezeptors zurückgeführt. Dieser Rezeptor wird von Zellen mononukleär- phagozytärer Herkunft exprimiert, z. B. von Monozyten und Makrophagen, aber auch von Osteoklasten und Mikroglia [70, 71]. Mit Hilfe der semiquantitativen PCR wurde die mRNA- Expression des M-CSF- Rezeptors bestimmt. Nach Stimulation der U937- Zellen mit 10nM PMA wurde die mRNA- Expression zu drei verschiedenen Zeitpunkten (24h, 48h, 72h) gemessen. Verglichen wurde mit Ethanol (Kontrolle), normalisiert wurde zu β -Actin. In der Ethanolkontrolle liegt unter den angegebenen Versuchsbedingungen zu keinem Zeitpunkt eine Expression des M- CSF- Rezeptors vor. Diese erfolgt erst nach PMA- Stimulation der Zellen (Abbildung 4C).

Funktionelle und regulatorische Analysen zur miR-21 im myeloiden Differenzierungsmodell U937

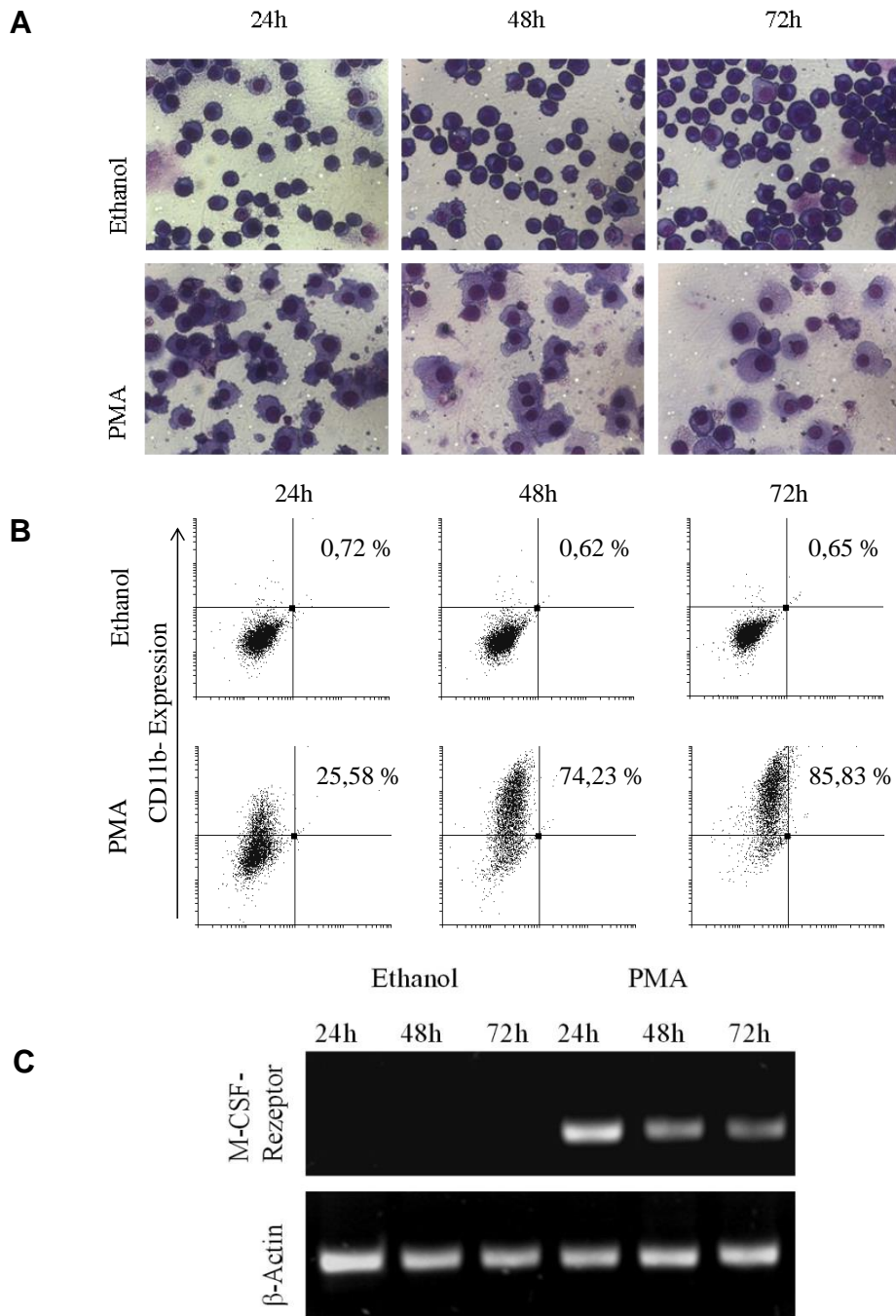


Abbildung 4: PMA- induzierte myeloide Differenzierung von U937- Zellen

A In der May- Grünwald- Färbung zeigen U937- Zellen nach PMA- Stimulation (10nM) im Vergleich zur Ethanolkontrolle morphologische Veränderungen. Die Abbildung wurde in 400facher Vergrößerung fotografiert (Axio Vert 25, Axio Cam, Programm Axio Vision). n=6 **B** Die Durchflusszytometrie zeigt den prozentualen Anteil an CD11b-exprimierenden U937- Zellen nach Stimulation mit 10nM PMA im Vergleich zur Kontrolle (Ethanol) nach 24h, 48h und 72h. n=3 **C** Die semiquantitative PCR zeigt die Expression des M- CSF- R auf U937- Zellen nach PMA- Stimulation (10nM) verglichen mit der Kontrolle (Ethanol) zu drei Zeitpunkten (24h, 48h und 72h). Normalisiert wurde zu β- Actin. n=3

4.2 Die microRNA- Expression während der PMA- induzierten myeloiden Differenzierung von U937- Zellen

4.2.1 MicroArray- Analyse zum microRNA- Expressionsprofil während der PMA- induzierten myeloiden Differenzierung

In den letzten Jahren gerieten miRNAs zunehmend in den Focus der wissenschaftlichen Forschung. Sie sind in Zellproliferation, Differenzierungsprozesse und Apoptoseinhibition involviert. Aufgrund der Auswirkungen ihres Eingreifens in zelluläre Prozesse kommt ihnen eine wesentliche Rolle in der Entstehung maligner Erkrankungen und Tumorprogression zu. Im Rahmen wissenschaftlicher Forschung wurde gezeigt, dass verschiedene miRNAs im Krebs dysreguliert sind. Auch im Rahmen von Zellreifungs- und Differenzierungsprozessen verändert sich die Expression bestimmter miRNAs. Das Interesse der vorliegenden Arbeit gilt der Expression von miRNAs in der myeloiden Differenzierung.

Als initiale Untersuchung wurde eine MicroArray Analyse durchgeführt, um festzustellen, wie sich die Expression verschiedener MicroRNAs in der monozytären Differenzierung (Stimulation von U937- Zellen mit 10nM PMA) im Vergleich zur Kontrolle (proliferierende U937- Zellen behandelt mit Ethanol) verändert. Dazu wurden U937- Zellen 24h nach der PMA- Stimulation/ Ethanolbehandlung abgenommen, die RNA präpariert und mittels MicroArray die miR- Expression analysiert. Die Expression verschiedener MicroRNAs wurde in ein Verhältnis gesetzt und eine Ratio errechnet (PMA zur Ethanolkontrolle). Normalisiert wurde zu U6. Einige MicroRNAs waren nach PMA- Stimulation hochreguliert (miR-221, miR-222, miR-21), andere waren herunterreguliert (miR-671-5p, miR-23a, miR-320, miR-19a, miR-185, miR-494, miR-583 und miR-326) (Tabelle 9).

Tabelle 9: Veränderte Expression verschiedener microRNAs nach PMA-Stimulation (Vgl. PMA/ Ethanol norm. zu U6)

microRNA	Ratio (PMA / Ethanol)	Standardabweichung
hsa-miR-222	6.8	± 3.180
hsa-miR-221	3.6	± 0.590
hsa-miR-21	2.9	± 1.121
hsa-miR-671-5p	1.7	± 0.359
hsa-miR-23a	1.5	± 0.103
hsa-miR-320	0.6	± 0.092
hsa-miR-19a	0.4	± 0.063
hsa-miR-185	0.3	± 0.023
hsa-miR-494	0.3	± 0.037
hsa-miR-583	0.2	± 0.044
hsa-miR-326	0.1	± 0.027

Interessant war die Hochregulation der miR-21 während der monozytären Differenzierung, da die miR-21 bisher lediglich in verschiedenen soliden Tumoren als verstärkt exprimiert beschrieben ist [29, 40]. Sie gilt aktuell als onkogene microRNA, die anti- apoptotisch und proliferativ wirkt [69]. In Reifungs- und Differenzierungsprozessen wurde die Funktion der miR-21 noch sehr wenig beschrieben. Fujita et al. zeigten erstmals die Hochregulation der miR-21 nach PMA- Stimulation von HL-60- Zellen, einer promyelozytären leukämischen Zelllinie, die in ihren Charakteristika den U937- Zellen ähnelt [110]. Aufgrund der wissenschaftlichen Literatur und der Ergebnisse des MicroArrays richtete sich das Augenmerk auf die nähere Untersuchung der Funktion und Regulation der miR-21.

4.2.2 Analyse zur Expression der miR-21 in der PMA- induzierten myeloiden Differenzierung von U937- Zellen mittels RT- qPCR

Die Validierung der Daten des MicroArrays wurde mittels quantitativer PCR durchgeführt. Unter gleichen Versuchsbedingungen (U937 behandelt mit 10nM PMA vs. Ethanolkontrolle) wurde die Expression der miR-21 zu 4 verschiedenen Zeitpunkten (12h, 24h, 48h, 72h) gemessen.

Die Expression der miR-21 nach PMA- Stimulation im Vergleich zur Kontrolle (Ethanol) steigt nach 12h auf das 1,6fache, nach 24h auf das 2,1fache, nach 48h auf das 3,8fache und nach 72h signifikant auf das 3,3fache an (Abbildung 5).

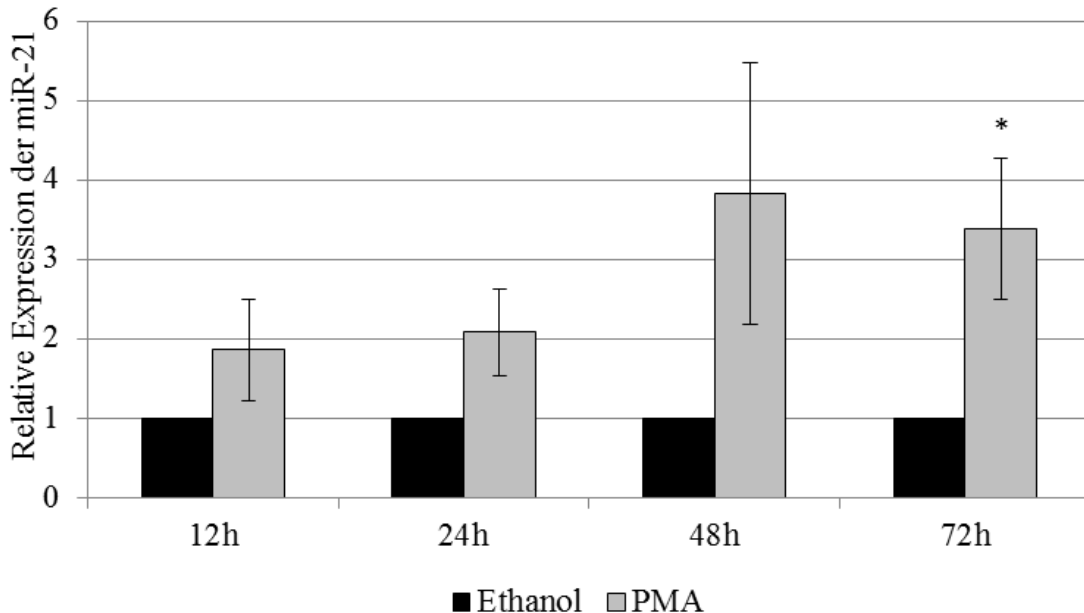


Abbildung 5: Die Expression der miR-21 steigt in der myeloiden Differenzierung
Mit Hilfe der quantitativen PCR wurde die Expression der miR-21 nach PMA-Stimulation (10nM) von U937- Zellen untersucht. Verglichen wurde mit der Kontrolle (Ethanol), normalisiert wurde zu U6. n=3 * $p \leq 0,05$ signifikant

4.3 Funktionelle Analysen zur miR-21

4.3.1 Ski als putatives Ziel der miR-21

Die miR-21 war bisher vor allem als onkogene miR bekannt, die in verschiedenen soliden Tumoren sowie in B- Zell- Lymphomen und CLLs hochexpimiert ist [93, 94]. Ihre Funktion und Regulation in Differenzierungsprozessen wie der Myelopoese ist aktuell noch unbekannt. In 3.2 konnte allerdings eine verstärkte Expression der miR-21 nach PMA-induzierter monozytärer Differenzierung gezeigt werden. Es war daher zu vermuten, dass die miR-21 funktionelle Bedeutung für die Myelopoese besitzt. Um eine mögliche putative Zielstruktur der miR-21 zu finden, wurden

verschiedene bioinformatische Programme (target prediction tools) genutzt. Vier Programme sagen unabhängig voneinander eine Bindestelle der miR-21 in der 3'UTR der Ski- mRNA vorher (targetscan, Diana Lab, miRDB, Pic Tar) (Abbildung 6). Die putative Bindestelle der miR-21 ist hochkonserviert.

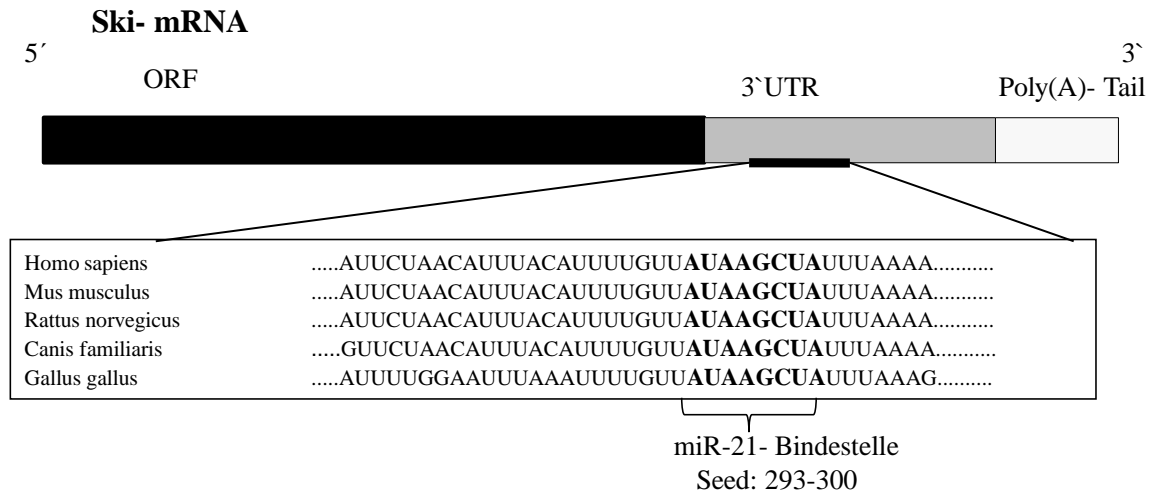


Abbildung 6: Putative Bindestelle der miR-21 in der 3'UTR der Ski- mRNA
Schematische Darstellung der Ski- mRNA- die Seed-Sequenz der miR-21 bindet an der 3'UTR von Ski bei 293-300 bp. Die putative Bindestelle der miR-21 ist hochkonserviert. *Quelle: targetscan*

Die Funktionen von Ski sind in der Literatur als vielfältig beschrieben. Es kann sowohl als Tumorsuppressor als auch als Proto- Onkogen agieren. Die Funktion von Ski ist von seinen jeweiligen Bindungspartnern abhängig [95]. Eine erhöhte Ski- Expression konnte in verschiedenen Malignomen nachgewiesen werden, z. B. in malignen Melanomen [97] und in AMLs [60, 61]. Divergent dazu konnte gezeigt werden, dass ein durch Mutation verursachtes Fehlen von Ski zur Tumorentstehung (besonders B- und T- Zell- Lymphome [101]) beiträgt. Ski übt scheinbar inverse Funktionen aus. In der Hämatopoese wurde Ski als Repressor der Differenzierung der myeloischen Reihe beschrieben. Über Interaktion von Ski mit dem myeloiden TF PU.1 kommt es zum Differenzierungsblock in hämatopoetischen multipotenten Progenitorzellen [103]. Ski trägt somit zur Leukämogenese bei. Um diesen Effekt experimentell zu bestätigen, wurde mittels RT-qPCR die Expression der Ski- mRNA während der myeloiden Differenzierung untersucht. U937- Zellen wurden mit 10nM PMA

bzw. Ethanol (Kontrolle) stimuliert. Die Zellabnahme erfolgte zu drei Zeitpunkten (24h, 48h, 72h). Nach der RNA- Präparation mit Trizol wurde die RT- qPCR durchgeführt. Als Vergleich diente Ethanol (Kontrolle), normalisiert wurde zu GAPDH. In der myeloiden Differenzierung nimmt die Expression der Ski- mRNA nach 24h auf das 0,8fache und nach 48h sowie 72h auf das 0,6fache (Abbildung 7) ab.

Die inverse Korrelation von Ski und der miR-21 sowie das Vorliegen einer putativen Bindestelle der miR-21 in der 3'UTR der mRNA von Ski führten zu der Hypothese, dass Ski als direktes Ziel der miR-21 fungieren könnte.

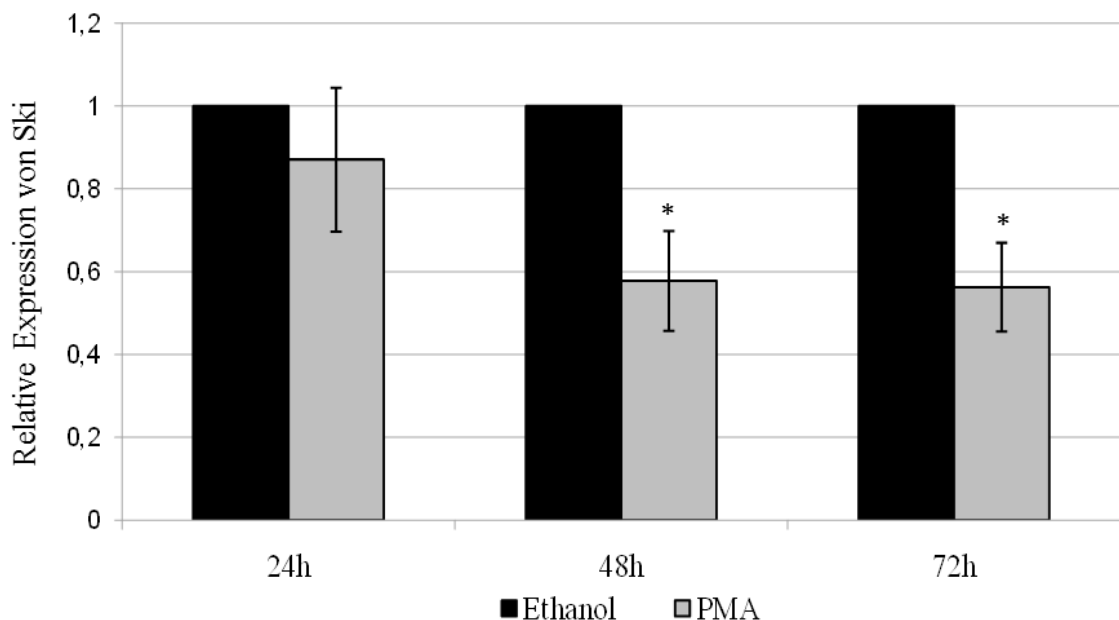


Abbildung 7: Die Expression von Ski- mRNA sinkt in der myeloiden Differenzierung

Nach der Stimulation von U937- Zellen mit 10nM PMA wurde mit RT-qPCR die Konzentration der mRNA von Ski zu drei Zeitpunkten gemessen. Verglichen wurde mit Ethanol normalisiert zu GAPDH. n=3 * p≤0,05 signifikant

4.3.2 Die miR-21 beeinflusst die Expression des M-CSF- R in der myeloiden Differenzierung

Der M- CSF-R ist ein bedeutender transmembranständiger Rezeptor, der nach Aktivierung mit verschiedenen myeloiden TF bzw. Proteinen interagiert und diese aktiviert [113]. Infolgedessen kommt es zur verstärkten Expression spezifischer myeloider Gene. M- CSF- R wird auf der Oberfläche von Zellen

mononukleärer Herkunft (Monozyten, Makrophagen, Osteoklasten [42]) verstärkt exprimiert. M-CSF-R reguliert dabei die monozytäre Differenzierung [109] sowie das Überleben, die Motilität und die Zelladhäsionsfähigkeit der Monozyten/ Makrophagen [24, 25, 92]. Ueki et al. beschrieben eine PU.1-abhängige Repression des M-CSF-R-Promotors durch Ski. Ski inhibiert über Interaktion mit HDAC3 (Histondeacetylase3) die Funktion des myeloiden TF PU.1. Da der Promotor des M-CSF-R PU.1-abhängig ist, kommt es folglich zu einer Hemmung der Expression des M-CSF-R [103]. Daraufhin ließ sich folgende Hypothese aufstellen: die miR-21 inhibiert die Expression von Ski. Die Ski-vermittelte Hemmung des PU.1-abhängigen M-CSF-R-Promotors wird dadurch verringert. Es folgen eine verstärkte Expression des M-CSF-R sowie monozytäre Differenzierung. Die miR-21 könnte über Wechselwirkung mit Ski die M-CSF-R-Expression verstärken. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden U937-Zellen mit den GFP-tragenden Plasmiden pcDNA 6.2 Vector (Kontroll- bzw. Leervektor) sowie pcDNA 6.2-miR-21 durch Elektroporation transient transfiziert.

Die Validierung der Transfektion bzw. die Transfektionseffizienz wurde nach 24h mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse gemessen. Fluoreszenzmikroskopisch ließ sich eine GFP-Expression nachweisen (Abbildung 8A). Durchflusszytometrisch wurde eine Transfektionseffizienz von 36% (pcDNA 6.2 Vector) bzw. 39,7% (pcDNA 6.2 miR-21) gemessen (Abbildung 8B).

24h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 1nM PMA stimuliert. Die Expression des M-CSF-R wurde zu zwei Zeitpunkten (24h und 48h) durch eine RT-qPCR bestimmt. 24h nach der PMA-Stimulation steigt die Expression von M-CSF-R-mRNA in den mit pcDNA 6.2-miR-21 transfizierten Zellen auf das 1,4fache an, nach 48h sogar auf das 1,6fache im Vergleich zur Kontrolle (pcDNA 6.2) (Abbildung 9).

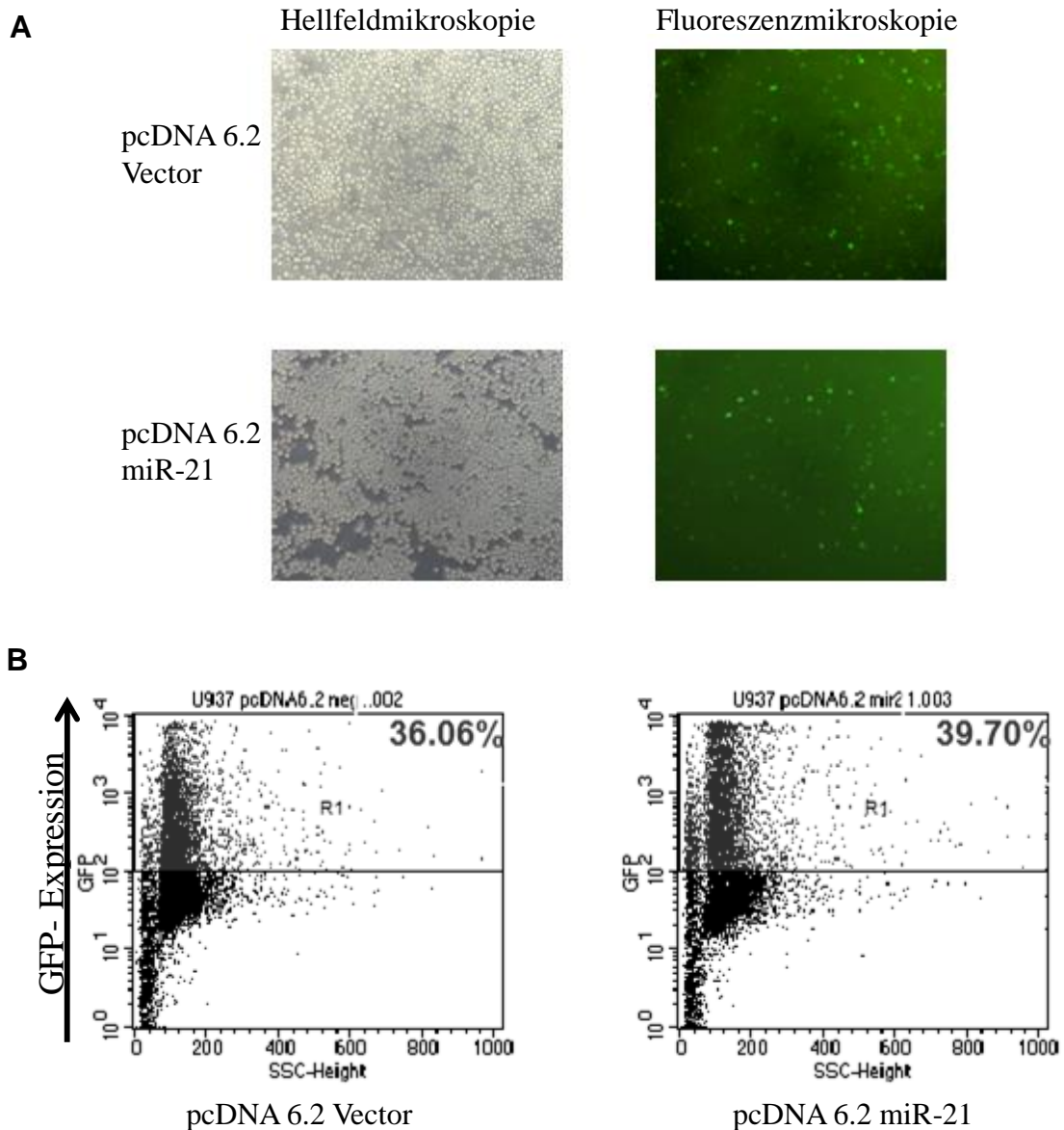


Abbildung 8: GFP- Expression 24h nach Transfektion von U937- Zellen mit pcDNA 6.2 Vector und pcDNA 6.2 miR-21 (Kontrolle der Transfektionseffizienz)
U937- Zellen wurden mit den GFP- tragenden Plasmiden pcDNA 6.2 Vector (Leervektor) sowie pcDNA 6.2 miR-21 transfiziert (Elektroporation). 24h später wurde die Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie validiert und die Transfektionseffizienz via FACS- Analyse bestimmt. **A** Mikroskopisches Bild im Vgl. Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie, 100fache Vergrößerung (Axio Cam, Zeiss). Die Zellen, die das GFP-tragende Plasmid haben, emittieren grünes Licht. **B** Die FACS- Analyse zeigt eine Transfektionseffizienz von 36% (pcDNA 6.2 Vector) bzw. 39,7% (pcDNA 6.2 miR-21).

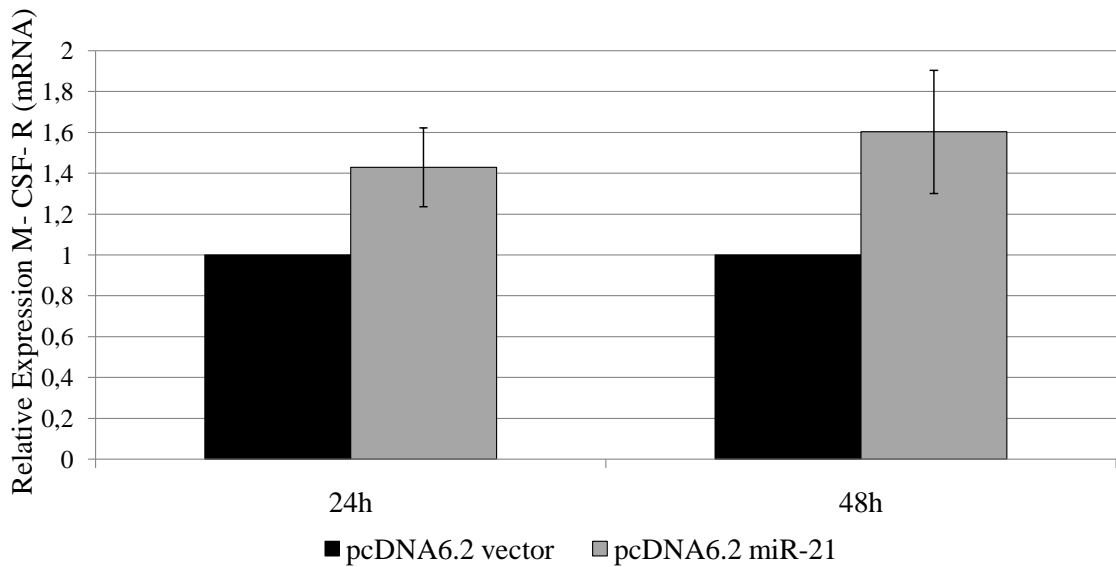


Abbildung 9: Eine Überexpression der miR-21 führt zur verstärkten Expression des M- CSF- R während der myeloiden Differenzierung

U937- Zellen wurden mit den Plasmiden pcDNA 6.2 Vector und pcDNA 6.2- miR-21 transient transfiziert (Elektroporation). 24h später wurden sie mit 1nM PMA stimuliert. Die Expression der M- CSF- R- mRNA wurde mittels RT- qPCR bestimmt. n=3

Aufgrund der durch die miR-21- Überexpression verstärkte Induktion des M- CSF- R wurde der Effekt der Inhibierung der miR-21 auf die M- CSF-R- Expression in PMA- induzierten differenzierenden myeloiden Zellen untersucht. Hierzu wurden LNAs (locked nucleic acids) verwendet. LNAs sind modifizierte RNA- Moleküle mit verbesserten Hybridisierungseigenschaften, die ihre Ziel- miRNA spezifisch binden und damit in ihrer Funktion inhibieren können [108, 109].

U937- Zellen wurden mit einer miR-21 spezifischen LNA und einer Scramble LNA als Kontrolle transient transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen mit 1nM PMA stimuliert. Die Zellabnahme erfolgte 24h und 48h nach der PMA- Stimulation. Die Expression von M-CSF-R- mRNA wurde mittels quantitativer PCR bestimmt. Sie ist in den mit LNA miR-21 transfizierten Zellen im Vergleich zur Scramble LNA nach 24h sowie 48h um 50% reduziert (Abbildung 10).

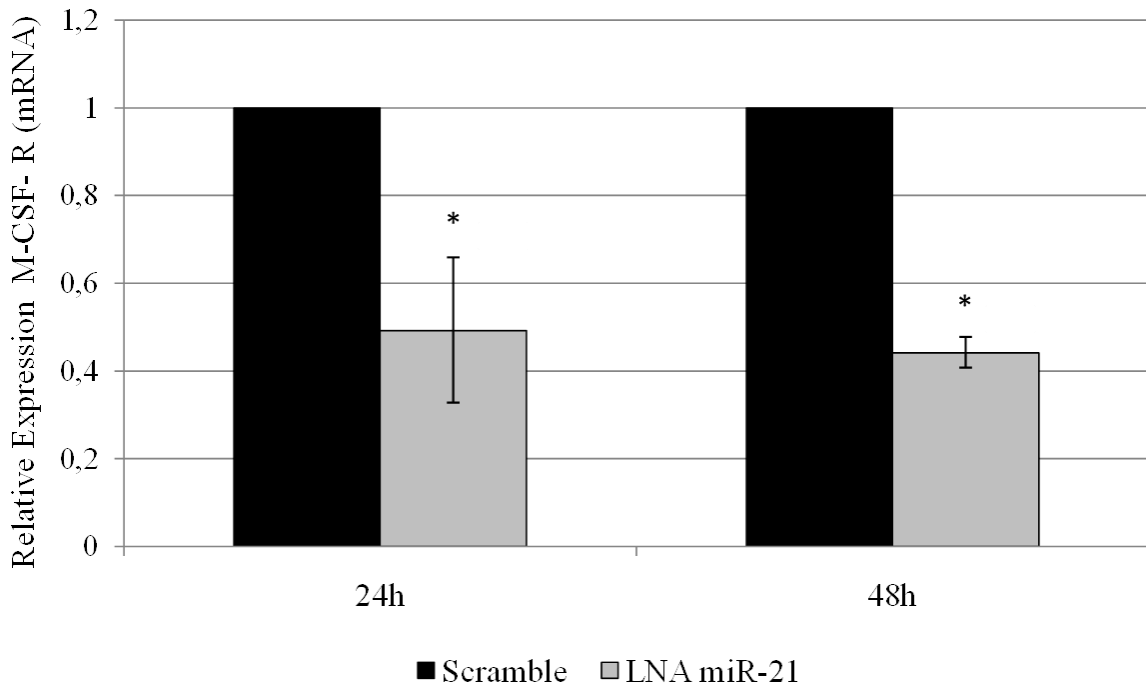


Abbildung 10: Ein miR-21- Block in PMA- stimulierten U937- Zellen führt zur Reduktion der Expression der M- CSF- R- mRNA

U937- Zellen wurden mit einer LNA miR-21 und einer Kontroll- LNA (Scramble) transfiziert. 24h später wurden die Zellen mit 1nM PMA stimuliert. 24h bzw. 48h nach dieser Stimulation wurde die Expression von M-CSF- R- mRNA mittels RT- qPCR gemessen. n=3, * p<0,05 signifikant

4.4 Untersuchungen zur Regulation der miR-21 durch PU.1

4.4.1 Die Expression des Transkriptionsfaktors PU.1 korreliert mit der miR-21- Expression in der myeloiden Differenzierung

PU.1 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor der Hämatopoese, der auch in der myeloiden Differenzierung eine bedeutende Rolle spielt. Der Verlust von PU.1, z.B. durch Mutation im Promotorbereich, resultiert in einer stark reduzierten Zahl myeloider Progenitorzellen [117]. PU.1- Knockout- Mäuse sterben in der Neonatalperiode an verschiedenen Infektionen- sie zeigen einen erheblichen Mangel an myeloiden Zellen sowie T- und B- Lymphozyten [68, 96]. Inadäquate PU.1- Expression in spezifischen hämatopoetischen Zellen kann zur leukämischen Transformation, z.B. zu T- Zell- Lymphomen [119] und AMLs

führen [120]. Mutationen im PU.1- codierenden Gen *SPI1* wurden bei etwa 7% der AML- Patienten identifiziert [120].

Die Regulation der miR-21 innerhalb der Differenzierung von Monozyten/ Makrophagen ist bisher ungeklärt. So stellte sich die Frage, welcher Faktor die direkte Regulation- also über Bindung am Promotor der miR-21- vermittelt. Die Promotorregion der miR-21 weist eine putative Bindungsstelle für den myeloiden TF PU.1 auf [71, 102] (Abbildung 11), der während der Myelopoese hoch exprimiert wird [110]. Aufgrund der vielfältigen und bedeutsamen Funktionen von PU.1 während der Myelopoese und des Bestehens einer putativen Bindestelle im Promotor der miR-21 wurde eine Wechselwirkung zwischen beiden hypothetisiert.

```

nGnnnTnTGGGnnAGnnnnnGnAGCTCnGnnnnnAnAAnnTnATCA
nnnATCnnTATnnnnnnnAnnTnnGAACAAGnTgnTnAnTAAngTA
nTgnAGTTTnTGTGCAAnnnnTCnnCCATAAAnCATGAAAnGATTn
nnnnCAnnGTTcATAGTTcCnnTCTTTGTTcCTTTGTTAATcAnnnn
nnnCTGACnnnTGGGAGGnGCCTnCnnAnTTTGCTAATGCATTCTT
TnTGGATAAGGATGACGCACAGATTGTCCTAATAAGGACTTAGnTT
GAGAAAnnGnCCGnCnCCTnTGAGnAGAnnGGnCAAGTCAnnnnn
AGGGCGnGCAGTTTCTTTTTTAACTAGGGATGACACAAGCAnAAGT
CATTTCCTTATTAAATTGGTTCAAACCAGTTCTTACAGGAACTnGTG
GTGATAAATGTGGGACTTCTGAGAAGTCATTcATTnATTCTTTGn
GCCnnAnCAGAGnA

```

→ pri-miR-21

 TATA box	 GC box	 SRF
 AP-1	 Ets/PU.1	 STAT3
 C/EBP	 NFI	 p53

Abbildung 11: Sequenz des putativen Promotorbereiches der miR-21 (nach Fujita et al. [110])

Konservierte Basen bei Vertebraten sind in Großbuchstaben geschrieben, nicht-konservierte Basen oder Deletionen wurden mit ‚n‘ gekennzeichnet. Der Pfeil markiert den Transkriptionsbeginn der pri- miR-21. Die konservierten Bindestellen verschiedener TF wurden mit unterschiedlichen Farben hervorgehoben.

Zunächst erfolgte die Validierung des Expressionsanstiegs von PU.1 während der Myelopoese. Dazu wurden U937- Zellen mit 10nM PMA sowie Ethanol (Kontrolle) behandelt. Die Zellabnahme erfolgte 24h, 48h und 72h nach der Stimulation. Verglichen wurde mit Ethanol, normalisiert zu GAPDH. Zur Bestimmung des PU.1- mRNA- bzw. Proteinlevels wurde eine quantitative PCR und ein Western Blot durchgeführt. Die Expression der PU.1- mRNA steigt auf das 2,6fache nach 24h, auf das 2,9fache nach 48h und auf das 5,4fache nach 72h an (Abbildung 12A). Die densitometrische Messung des Western Blots zeigt nach 24h einen 2,2fachen bzw. nach 48h einen 1,7fachen Anstieg des PU.1- Proteins (Abbildung 12B).

Funktionelle und regulatorische Analysen zur miR-21 im myeloiden Differenzierungsmodell U937

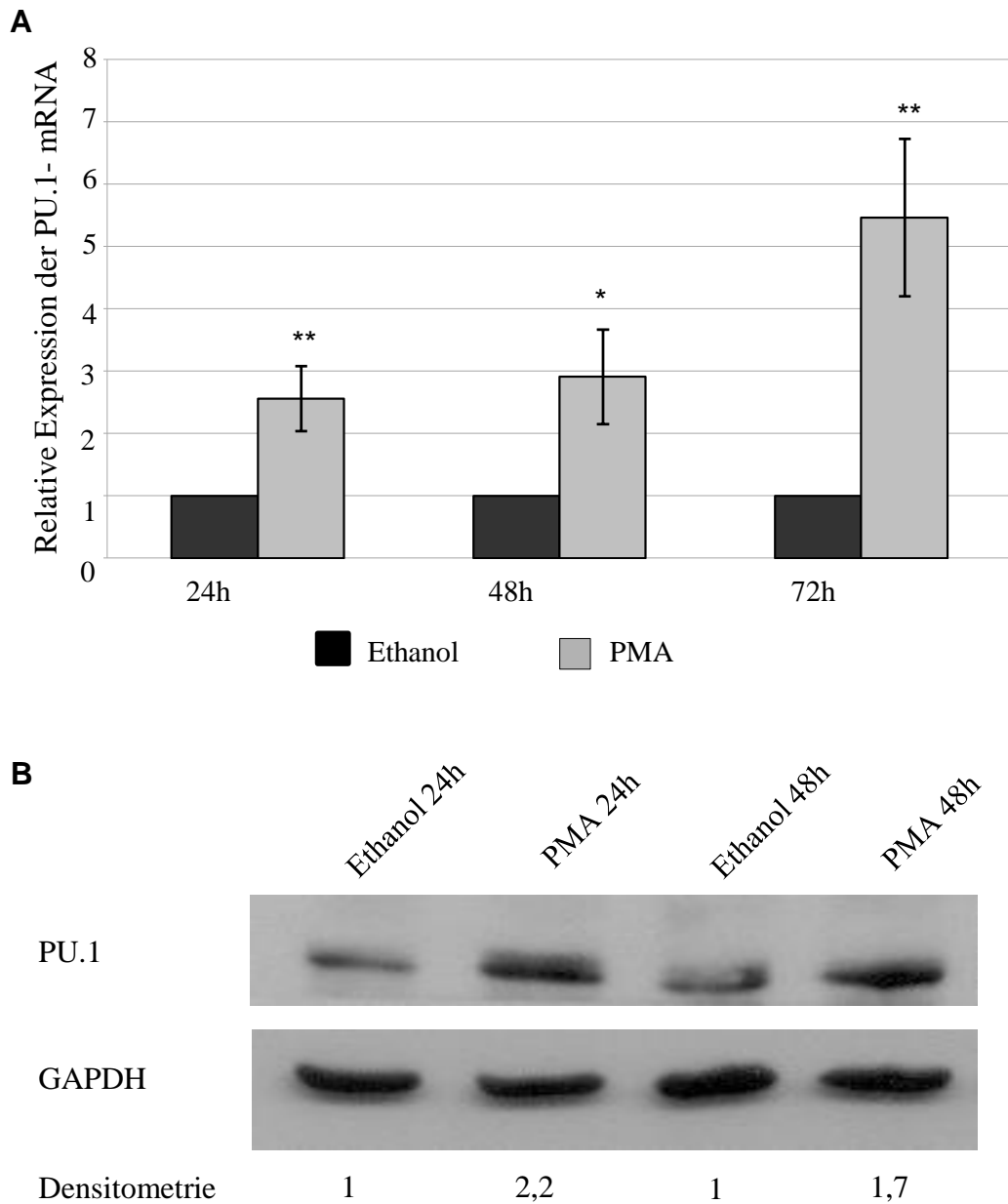


Abbildung 12: Die Expression des TF PU.1 steigt in der myeloiden Differenzierung an

Expressionsanalysen zum PU.1- mRNA- und Proteinlevel nach Stimulation der U937-Zellen mit 10nM PMA. Verglichen wurde mit Ethanol normalisiert zu GAPDH. **A** Die Messung der PU.1- mRNA- Konzentration erfolgte mittels RT- q PCR. n=3 * $p \leq 0,05$ signifikant ** $p \leq 0,01$ hoch signifikant **B** Die Bestimmung der PU.1- Proteinmenge wurde mittels Western Blot- Analyse durchgeführt. n=3

4.4.2 PU.1- Überexpression induziert die Expression der miR-21

Aufgrund der Korrelation von PU.1 und der miR-21 während der myeloiden Differenzierung sowie der vorhergesagten putativen Bindestellen von PU.1 am Promotor der miR-21 wurde eine Wechselwirkung zwischen beiden Faktoren postuliert.

Um dies zu prüfen, wurden U937- Zellen mit dem PU.1- Gen- tragenden Plasmid pcDNA 3.1- PU.1 und pcDNA 3.1 (Kontrolle) transient transfiziert (Elektroporation). Die Überexpression von PU.1 wurde 24h später mit Hilfe einer semiquantitativen PCR validiert (Abbildung 13A). 24h bzw. 48h nach der Transfektion wurde die Expression der miR-21 mittels RT- qPCR bestimmt. Die Überexpression von PU.1 führte im Vergleich zur Kontrolle (pcDNA 3.1) nach 24h zu keinem Anstieg der Expression der miR-21, jedoch nach 48h zu einem 2,7fachen signifikanten Anstieg (Abbildung 13B).

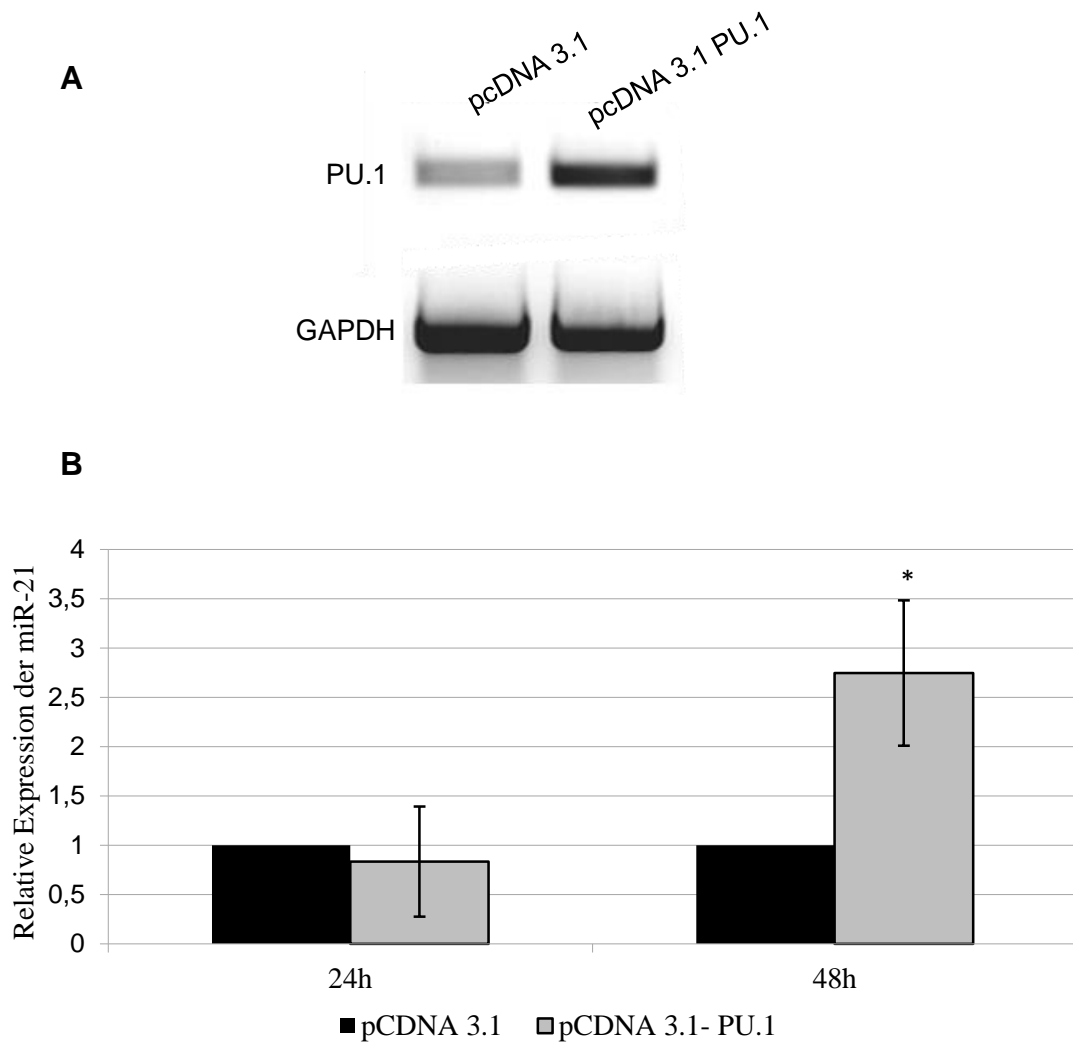


Abbildung 13: PU.1 induziert die Expression der miR-21

Transiente Transfektion (Elektroporation) von U937- Zellen mit einem PU.1- Gen-tragenden Plasmid (pcDNA 3.1- PU.1) und einem Kontrollplasmid (pcDNA 3.1). **A** Die Transfektion wurde nach 24h mit semiquantitativer PCR validiert. **B** Die miR-21- Expression wurde 24h und 48h nach der Transfektion mittels RT- qPCR bestimmt. Verglichen wurde mit der Kontrolle (pcDNA 3.1). Normalisiert wurde zu U6. n=3, * p<0,05 signifikant

Die Korrelation der Expression der miR-21 und des TF PU.1 sowie das Vorliegen einer putativen Bindestelle von PU.1 im Promotorbereich der miR-21 lassen die Hypothese zu, dass PU.1 in der Regulation der miR-21 eine Rolle spielt.

5 Diskussion

5.1 Hintergrund

Die Hämatopoese ist ein komplexer Prozess, in dessen Verlauf es zur Ausreifung von HSCs zu final differenzierten Blutzellen kommt. Diese Kaskade wird durch die Interaktion verschiedener Transkriptionsfaktoren sowie das Zusammenspiel intra- und extrazellulärer Signale gesteuert. Auch microRNAs sind in diese Regulationsprozesse involviert. Mutationen bzw. Störungen innerhalb dieser Mechanismen können zur genetischen Fehlregulation und folglich zum Ungleichgewicht zwischen Proliferation, Apoptose und Zellreifung führen. Diese Dysbalance bildet die Grundlage der Leukämogenese. Der Fokus der wissenschaftlichen Forschung richtet sich auf die Identifizierung relevanter miRs, ihre Regulation sowie die Interaktion mit ihren Ziel- mRNAs. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Rolle der bisher lediglich als onkogene miRNA bekannten miR-21 während der myeloiden Differenzierung. In ihrer Funktion als OncomiR konnten schon einige Zielstrukturen validiert bzw. Regulationsmechanismen postuliert werden. Die Funktion und Regulation der miR-21 in Differenzierungsprozessen ist bisher noch weitgehend ungeklärt.

5.2 Das myeloide Differenzierungsmodell U937

Ein allgemein etabliertes Modell zur Untersuchung der myeloiden Differenzierung stellt die U937- Zelllinie dar, die nach Stimulation mit PMA mit der myeloiden Differenzierung beginnt [86–88, 90, 94]. Da dieses Modell die Grundlage der vorliegenden Arbeit darstellt, wurde seine Funktionalität zu Beginn überprüft. Die nach der PMA- Stimulation einsetzende myeloide Differenzierung der U937- Zellen geht mit der Induktion verschiedener Gene und folglich mit der Expression spezifischer Marker und Veränderungen der Zellmorphologie einher.

Farokhzad et al. beschrieben die Induktion des *CD11b- Gens* nach PMA-Stimulation von U937- Zellen, sodass eine verstärkte Expression von CD11b auf der Oberfläche der Phagozyten feststellbar war [121]. Baek et al. konstatierten ebenso den Expressionsanstieg von CD11b nach PMA-induzierter myeloider Differenzierung von U937- Zellen [122]. Von beiden Autoren wurde CD11b als phagozytärer Marker verwendet, der die Reifung der pro- myelozytären U937- Zellen in Monozyten und Makrophagen aufzeigte. Ein weiterer myeloider Marker ist der M- CSF- R, der in undifferenzierten U937- Zellen nicht exprimiert wird, während der monozytären Differenzierung jedoch stark ansteigt [112- 115]. Dieser Rezeptor wurde zur Validierung der phagozytären Entwicklung genutzt [124].

In der vorliegenden Arbeit wurde die monozytäre Reifung von U937- Zellen nach PMA- Induktion durch die Messung von CD11b via FACS, M- CSF- R via sqPCR sowie morphologisch über Cytospin belegt. Nach Behandlung der U937- Zellen mit 10nM PMA/ Ethanol (Kontrolle) wurden die Zellen zu 3 Zeitpunkten (24h, 48h, 72h nach Stimulation) auf das Vorliegen bzw. die Expression der o.g. Differenzierungsmarker hin untersucht. Mit PMA stimulierte U937- Zellen zeigen im Vergleich zur Ethanolkontrolle einen deutlichen Anstieg der Expression des CD11b- Rezeptors auf der Zelloberfläche. Während bei der Ethanolkontrolle die Expression des Rezeptors zu allen drei Zeitpunkten unter 1% bleibt, steigt sie bei den PMA- stimulierten Zellen nach 24h auf 25%, nach 48h auf 74% und nach 72h auf 85% an. Nach 48h ist die Mehrheit der Zellen CD11b- tragend, sodass man davon ausgehen kann, dass die meisten Zellen in Differenzierung befindlich oder ausdifferenziert sind. Nach 24h sind lediglich 25% aller Zellen myeloisch differenziert. Die Expression des M- CSF- Rezeptors (mRNA- Level) wird bereits 24h nach PMA- Stimulation induziert (im Vergleich zu CD11b, welcher erst nach 48h verstärkt exprimiert wird) und über 72h aufrecht erhalten, wobei in der Ethanolkontrolle keine Expression vorliegt. Der M- CSF- R ist für die Induktion sowie die Aufrechterhaltung der myeloiden Differenzierung verantwortlich, sodass er bereits zu Beginn der Reifung involviert ist und dadurch früher und stärker exprimiert wird. Die morphologische

Untersuchung der Zellen spiegelt die myeloide Entwicklung der Zellen wider- differenzierte Zellen zeigen einen typisch monozytären Phänotyp. Sie zeigen eine zu Gunsten des Plasmas veränderte Kern- Plasma- Relation, eine Zunahme der basophilen Granula sowie einen polymorphen Phänotyp nach 24h und eine verstärkte Vakuolarisierung des Plasmas nach 72h. Außerdem werden die Zellen bereits nach 24h adhärent. Die myeloide Differenzierung der U937- Zellen schreitet über 72h deutlich voran. Nach 48h sind die morphologischen Merkmale der Monozyten stark ausgeprägt. Nach 72h weisen fast alle Zellen diesen Phänotyp auf.

CD11b und M- CSF- R wurden in der Literatur als spezifische Marker verwendet, um die monozytäre Differenzierung von U937- Zellen nach PMA- Induktion zu belegen [112- 115]. Auch in dieser Arbeit wurden diese beiden Marker genutzt. CD11b steigt nach PMA- Stimulation signifikant an, wobei in der Ethanolkontrolle die Expression nahezu fehlt. Der M- CSF- R zeigt sogar einen On- Off- Effekt, die Expression findet erst nach Induktion statt. Das zytomorphologische Bild zeigt einen typisch monozytären Phänotyp. Diese Untersuchungen zeigen, dass die Differenzierung schon nach 24h nachweislich begonnen hat. Der Anteil an CD11b- tragenden Zellen und Zellen mit monozytärem Phänotyp steigt nach 48h stark an und ist nach 72h nahezu vollständig. Diese Fakten weisen das Stattfinden der myeloiden Differenzierung unter den gegebenen Versuchsbedingungen nach. Meine Ergebnisse entsprechen somit der aktuellen Literatur.

5.3 Hochregulation der miR-21 in der myeloiden Differenzierung

Zahlreiche Studien haben bereits gezeigt, dass MicroRNAs in verschiedene Prozesse wie Zellproliferation, Apoptose und Krebsentstehung, aber auch in hämatopoetische Zelldifferenzierung involviert sind. Welche MicroRNAs allerdings welche Funktion ausüben, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Um einen ersten Überblick über die Expression verschiedener MicroRNAs

während der myeloiden Differenzierung zu bekommen, wurde eine MicroArray Analyse durchgeführt. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht in der Möglichkeit, mehrere miRs gleichzeitig zu detektieren und sich so einen allgemeinen Überblick über die Expression verschiedener miRs zu verschaffen. Zur Probengewinnung wurden 1×10^6 U937- Zellen mit 10nM PMA/ Ethanol (Kontrolle) stimuliert. Die Analyse erfolgte nach 24h. Es zeigte sich eine Herunterregulation verschiedener miRs innerhalb der myeloischen Differenzierung z. B. miR- 185 oder miR- 494, aber auch eine Hochregulation unterschiedlicher miRs, z.B. miR-221/222 oder miR-21 (Tabelle 9). Besonders interessant war der Expressionsanstieg der miR-21. Die miR-21 war bisher als onkogene miR bekannt, die in verschiedenen soliden Tumoren hoch exprimiert wird (Tabelle 3) [62, 67, 114, 115]. Im Gegensatz dazu jedoch steht ihre Hochregulation in der myeloiden Differenzierung. Chen et al. und Kasashima et al. konnten via MicroArray den Anstieg der Expression der miR-21 während der durch PMA- induzierten myeloiden Differenzierung von HL- 60- Zellen zeigen [114, 115]. Houbaviy et al. fanden heraus, dass die miR-21 während der durch Retinolsäure induzierten Differenzierung von ES (embryonalen Stammzellen) hochreguliert wird, wobei die ES selbst kaum miR-21 exprimieren [127]. Diese Daten lassen vermuten, dass der miR-21 eine wichtige Rolle innerhalb verschiedener Differenzierungsprozesse, speziell innerhalb der myeloiden Reifung zukommt. Bisher liegen allerdings keine Daten über die Expression der miR-21 innerhalb der myeloiden Differenzierung von U937- Zellen vor, sodass diese Thematik in den Fokus dieser Arbeit rückte. Ziele waren die Klärung der Funktion sowie die Regulation der miR-21 während der monozytären Differenzierung von U937- Zellen.

Zur Überprüfung und Bestätigung der Ergebnisse des MicroArrays wurde eine RT- PCR durchgeführt. Hierfür wurden 1×10^6 U937- Zellen mit 10nM PMA/ Ethanol (Kontrolle) behandelt. Die Expression der miR-21 wurde zu drei Zeitpunkten gemessen (24h, 48h, 72h) und zu U6 normalisiert. Nach 72h steigt die Expression der miR-21 signifikant um den Faktor 3,3 an. Diese Tendenz ist bereits nach 24h und 48h deutlich zu sehen. Dies ist auch in Übereinstimmung

mit dem Fortschreiten der monozytären Differenzierung zu bringen, nachvollzogen anhand des Anstieges von CD11b und den Veränderungen der Zellmorphologie.

In einem ähnlichen System (Modell HL-60+PMA) wie das in der vorliegenden Arbeit verwendete U937- Differenzierungsmodell wurde der Anstieg der Expression der miR-21 publiziert. Kasashima et al. konnten nach 48h einen 6fachen Anstieg der Expression der miR-21 im Northern Blot zeigen [52]. Chen et al. (2008) beschrieben nach einer MicroArray- Analyse eine 3,6fache Hochregulation der miR-21 nach 24h [53]. Beide Arbeitsgruppen verwendeten jedoch unterschiedliche Konzentrationen von PMA. Chen et al. setzten 0,3µM und Kasashima et al. 16nM PMA ein. Die Differenzierungsrate der HL- 60- Zellen schwankt bei beiden Autoren zwischen 60-80% zu beiden Zeitpunkten (24h und 48h). Dies ist vergleichbar mit der Rate an reifen Monozyten in dieser Arbeit zu den entsprechenden Zeitpunkten. Die Hochregulation der miR-21 beträgt in der vorliegenden Arbeit nach 24h 2- 2,9fach (PCR und MicroArray) und nach 48h 3,8fach (PCR). Die Unterschiede zwischen den Messwerten für den Anstieg der miR-21 während der myeloiden Differenzierung in dieser Arbeit und den Messwerten in beiden genannten Publikationen lassen sich auf folgende Fakten zurückführen: beide Modelle- HL-60+PMA sowie U937+PMA- ähneln sich, sind aber nicht identisch; die Konzentration des verwendeten PMA sowie die Zahl der induzierten Zellen sind unterschiedlich (Kasashima 16nM auf $0,2 \times 10^6$ Zellen, Chen 0,3µM auf 10^6 Zellen, Lehretz 10nM PMA auf 10^6 Zellen) und die Verfahren zur Expressionsmessung der miR-21 sind nicht gleich (Kasashima Northern Blot, Chen MicroArray, Lehretz MicroArray und RT- qPCR). Die RT- qPCR stellt insgesamt die genaueste und sensitivste Methode zur miR- Expressionsmessung dar, da hierbei spezifische RT- und qPCR- Primer verwendet werden. Trotz unterschiedlicher Versuchsbedingungen und Methoden, aber ähnlicher Systeme, zeichnete sich die gleiche Tendenz ab- die Expression der miR-21 steigt während der monozytären Differenzierung an.

5.4 Die Funktion der miR-21 innerhalb der monozytären Differenzierung

5.4.1 Das OnkoProtein Ski als putatives Ziel der miR-21

Im Rahmen einer *InSilico*- Analyse konnte das OnkoProtein Ski als putatives Ziel der miR-21 ermittelt werden. Targetscan benennt putative miR-Bindungen anhand der Komplementarität der Basenpaarung zwischen miRNA und Ziel-mRNA, vor allem innerhalb der Seed- Sequenz. Laut targetscan.org besitzt die miR-21 eine hochkonservierte Bindestelle in der 3'UTR der mRNA von Ski. Innerhalb der Literatur gibt es aktuell keine publizierten Daten, die eine Wechselwirkung von Ski und der miR-21 bestätigen würden. Weitere Fakten deuten eine Rolle von Ski in myeloiden Signalwegen an. Ritter et al. zeigten eine Hochregulation von Ski in AMLs mit Deletionen des Chromosom 7 (-7/del 7q) im Vergleich zu hämatopoetischen Stammzellen bzw. AMLs mit normalem Karyotyp. Weiterhin bestätigten sie eine Ski- vermittelte Differenzierungsblockade der ATRA- induzierten myeloiden Reifung von U937- Zellen [128]. Ski scheint als Repressor des ATRA- induzierten Signalweges zu fungieren. Teichler et al. stellten fest, dass der bei AMLs und APLs vorliegende Differenzierungsblock über eine Beteiligung von Ski, das RAR α inhibiert, von Statten geht [129]. Ueki et al. konnten zeigen, dass Ski über Rekrutierung der HDAC3 den myeloiden TF PU.1 in seiner Funktion inhibiert, was u.a. zur Blockade der monozytären Differenzierung und Proliferation unreifer Vorläuferzellen führt [103].

Die beschriebene antidifferenzierende und pro- proliferative Funktion von Ski auf Signalwege und Faktoren der myeloiden Differenzierung sowie die vorhandene putative Bindestelle der miR-21 in der 3'UTR der Ski- mRNA rückten Ski in den Fokus des Interesses. Es wurde hypothetisiert, dass Ski ein direktes Ziel der miR-21 darstellen und als solches von ihr inhibiert werden könnte. Damit würde die hemmende, pro- proliferatorische Funktion von Ski reprimiert und die myeloide Differenzierung aktiviert werden. Um diese Hypothese zu validieren, wurde die Expression der Ski- mRNA (RT-qPCR)

während der monozytären Differenzierung der U937- Zellen bestimmt. Dazu wurden U937- Zellen mit 10nM PMA/ Ethanol (Kontrolle) behandelt. Die Messung der Ski- Expression auf mRNA- Level erfolgte zu 3 Zeitpunkten (24h, 48h, 72h). Nach 48h bzw. 72h kam es zu einer signifikanten Reduktion der Ski- Expression auf das 0,6fache (3.3.1).

5.4.2 Die miR-21 als positiver Regulator des M- CSF- R

Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Hochregulation der miR-21 im Modell U937 sowie der bereits publizierten Daten über einen Expressionsanstieg der miR-21 im Modell HL- 60+PMA [42, 43], wurde dieser speziellen miR eine bedeutende, bisher unbekannte Funktion bzw. die Involvierung in verschiedene myeloide Signalwege zuerkannt [42, 43]. Um die funktionelle Bedeutung der miR-21 zu klären, wurden Wechselwirkungen mit myeloiden TF, Rezeptoren, Zytokinen oder anderen für die Monozytopoese essenziellen Elemente hypothetisiert. Eines dieser Elemente ist der M- CSF- R. Eine indirekte Wechselwirkung zwischen der miR-21 und dem M- CSF- R scheint durchaus denkbar. Die Literaturanalyse ergab folgende Ergebnisse. Riccioni et al. zeigen, dass es nach ATRA- (all-trans-retinoic acid) sowie PMA- Stimulation von NB4- Zellen (zur Reifung induzierbare APL- Zelllinie mit der Translokation t(15;17)) und von Proben verschiedener APL- Patienten zu einem signifikanten Anstieg des M- CSF- R auf Protein- und mRNA- Level kam [130]. ATRA als Retinolsäurederivat kann bestimmte leukämische Zelllinien zu granulozytärer und monozytärer Differenzierung anregen. Weiterhin konnten Riccioni et al. zeigen, dass die Transfektion mit dem miR-21 codierenden *c- fms- Gen* zu einer Zunahme der monozytären Entwicklung der APL- Zellen und auch zum Anstieg des M- CSF- R führte [130]. Meine Daten unterstützen ebenfalls die Hypothese einer indirekten Wechselwirkung zwischen der miR-21 und dem M- CSF- R. Nach Induktion der myeloiden Differenzierung von U937- Zellen mit PMA ist die miR-21 nach 24h 2fach und nach 48h 3,8fach hochreguliert (Abbildung 5), der M- CSF- R ist erst nach PMA- Stimulation nachweisbar (Abbildung 4C).

Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die Veränderung der Expression des M-CSF-R nach Überexpression bzw. Inhibierung der miR-21 bestimmt. Dazu wurde die miR-21 durch Einbringen eines Plasmides (pcDNA6.2 miR-21 bzw. 6.2 Vector als Leerkontrolle) in U937-Zellen überexprimiert. Nach Validierung der Transfektion (24h) und der Bestimmung der Transfektionseffizienz (etwa 40%), wurde die Differenzierung durch Stimulation mit 1nM PMA induziert. 24h bzw. 48h nach der Induktion wurde die Expression der M-CSF-R-mRNA mit RT-qPCR gemessen. Im Vergleich zum Leervektor steigt die M-CSF-R-Expression 24h bzw. 48h nach Induktion 1,4fach bzw. 1,6fach an. Der Expressionsanstieg nach Überexpression der miR-21 und PMA-Stimulation ist nur gering. Dies könnte verschiedene Ursachen haben:

1. Da die endogene Expression des M-CSF-R und der miR-21 durch die PMA-Stimulation bereits stark hochreguliert ist, wäre es denkbar, dass keine stärkere Expressionserhöhung durch die miR-21-Überexpression zu erreichen ist bzw. die auftretenden Unterschiede gering sind.
2. Die Transfektionseffizienz beträgt 40%, d.h. in 40% der verwendeten U937-Zellen konnte das Plasmid eingebracht werden. Für die RT-qPCR des M-CSF-R wurden jedoch 100% der Zellen verwendet. Insgesamt ist der Effekt einer 1,4 bzw. 1,6fachen Hochregulation des M-CSF-R also durchaus aussagekräftig.

Aufgrund der geringen Expressionserhöhung des M-CSF-R wurde das inverse Experiment dazu durchgeführt. Die miR-21 wurde durch eine spezifische LNA in ihrer Funktion blockiert. Die Veränderungen der mRNA-Expression des M-CSF-R wurden mittels RT-qPCR bestimmt. Verglichen wurde mit einer unspezifischen Scramble LNA als Kontrolle. U937-Zellen wurden dazu mit der LNA miR-21 und LNA Scramble transfiziert (Elektroporation). 24h nach der Transfektion wurde die Zelldifferenzierung mit 1nM PMA induziert. 24h und 48h nach der PMA-Stimulation wurde die mRNA-Expression des M-CSF-R bestimmt. Verglichen mit der Scramble LNA konnte in den Zellen, in denen die miR-21 geblockt wurde, eine signifikante Absenkung der M-CSF-R-Expression um etwa 50% gemessen werden.

Überexpression sowie Blockade der miR-21 führten zu gleichgerichteten Expressionsveränderungen der M-CSF-R-mRNA innerhalb der monozytären Differenzierung. Damit scheint ein funktioneller Einfluss der miR-21 auf den M-CSF-R zu existieren. Die Wechselwirkung der miR-21 auf den M-CSF-R ist als indirekte Wirkung anzunehmen.

Diese Ergebnisse stützen die Vermutung, dass es eine Art regulatorischen Weg zwischen der miR-21, Ski und dem M-CSF-R geben könnte. Die miR-21 hat eine postulierte Bindestelle (target prediction tools) in der 3'UTR von Ski. Da miRs hemmende Funktion auf ihre Zielstruktur ausüben, käme es zur Inhibierung von Ski durch die miR-21. Ueki et al. beschrieben eine direkte Wechselwirkung von Ski auf den M-CSF-R [103], sodass es denkbar wäre, dass Ski, bisher überwiegend als Repressor der Differenzierung beschrieben, dann die Regulation des M-CSF-R beeinflussen, diesen also hemmen könnte.

5.5 Die Regulation der miR-21 durch den myeloiden TF PU.1

Um die Frage zu klären, durch welche Faktoren und Mechanismen die miR-21 reguliert wird, muss man folgende Fakten und Hypothesen berücksichtigen:

1. Die überwiegend als onkogen beschriebene miR-21 ist in der myeloiden Differenzierung hochreguliert (Modell HL-60+PMA [46, 47]). Dieser Fakt konnte in der vorliegenden Arbeit auch für das System U937+PMA bestätigt werden.
2. Bisher ist die funktionellen Bedeutung der miR-21 während der monozytären Differenzierung weitgehend unbekannt. Aufgrund des starken Effektes auf den M-CSF-R, der als wichtiger monozytärer Marker und Faktor gilt, wäre eine bedeutende Funktion innerhalb der Myelopoese zu vermuten. Daher wäre eine Regulation durch einen ebenfalls in die myeloide Differenzierung involvierten Faktor anzunehmen. Einer der wichtigsten TF der Myelopoese ist PU.1.

PU.1 steuert die Entwicklung von B-Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen über Interaktionen mit verschiedenen Bindungspartnern [86].

Desweiteren bindet PU.1 an den Promotoren wichtiger myeloider Faktoren, z.B. CD11b [89] und M-CSF-R [131]. Fujita et al. bzw. Krichevsky et al. postulierten, dass die Sequenz des miR-21-Promotors mehrere konservierte Bindestellen bei Vertebraten enthält, u. a. auch Bindestellen für AP-1, C/EBP oder PU.1 [71, 102]. Fujita et al. konnten die PU.1-Bindung am miR-21-Promotor mittels Luciferase-Assay sowie ChIP-Analyse belegen. Allerdings führten sie den Nachweis dieser Promotorbindung in HL-60-Zellen+PMA bzw. 293FT-Zellen (embryonale Nierenzellen) durch. Nachdem man sich diese Daten und die vermutliche Bedeutung der miR-21 in der Myelopoese vergegenwertigt hat, scheint PU.1 als möglicher Regulator im Modell U937+PMA durchaus wahrscheinlich. Um diese These zu prüfen, wurde zu Beginn der Expressionsanstieg von PU.1 während der Monozytopoese verifiziert, der von verschiedenen Autoren an unterschiedlichen Modellen bereits belegt wurde [108, 126, 127]. Dazu wurden U937-Zellen mit 10nM PMA/ Ethanol (Kontrolle) stimuliert. Die Bestimmung des PU.1-mRNA-Levels erfolgte zu drei Zeitpunkten (24h, 48h, 72h) mittels RT-qPCR. Es zeigte sich ein signifikanter bzw. hochsignifikanter Anstieg der PU.1-Expression um das 2,5fache nach 24h bis auf das 5,3fache nach 72h. Die Messung des PU.1-Proteinlevels erfolgte über eine Western Blot-Analyse zu 2 Zeitpunkten (24h, 48h). Es wurde ein Anstieg des PU.1-Proteins um etwa das 2fache zu beiden Zeitpunkten deutlich. Um die Wirkungen einer Überexpression von PU.1 auf die Veränderung des Levels der miR-21 zu untersuchen, wurden U937-Zellen mit dem Plasmid pcDNA 3.1-PU.1 sowie einem Leerplasmid pcDNA 3.1 (Kontrolle) transfiziert (Elektroporation). Der Erfolg der Transfektion wurde nach 24h mit einer sqPCR validiert. Die Messung der Expression der miR-21 erfolgte mittels RT-qPCR zu 2 Zeitpunkten (24h, 48h). Nach 24h konnte noch keine Veränderung der miR-21-Expression detektiert werden. Nach 48h war ein signifikanter Anstieg der miR-21 auf das 2,7fache deutlich erkennbar. Die Tatsache, dass nach 24h noch kein messbarer Effekt auf die miR-21-Expression nachweisbar war, könnte daran liegen, dass die verwendeten Primer (TaqMan® MicroRNA Assay hsa-miR-21) lediglich die reife miR

erkennen und binden können. Erst nachdem die vermutete Promotorbindung von PU.1 stattgefunden hat, erfolgt die Transkription der miR. Es entsteht eine pri-miRNA, die über verschiedene Zwischenschritte (pre-miRNA, Bindung an RISC-Komplex...) zur reifen miRNA prozessiert wird. Aufgrund des Ablaufens dieser Reifungsschritte ist die Expression der reifen miR-21 vermutlich erst verzögert messbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Überexpression von PU.1 zum signifikanten Anstieg der miR-21 in U937-Zellen führt. Dieser Fakt, die Daten von Fujita et al. [110], die die direkte Bindung von PU.1 am Promotor der miR-21 zeigen sowie die Korrelation von PU.1- und der miR-21-Expression während der Myelopoese bestätigen, dass der gemessene Effekt sehr wahrscheinlich auf die direkte transkriptionelle Regulation der miR-21 durch PU.1 zurückzuführen ist.

5.6 Modell der Regulation und Funktion der miR-21 in der myeloiden Differenzierung (Modell U937+PMA)

Funktionell wurde eine Interaktion der miR-21 mit dem M-CSF-R hypothetisiert. Die Expression des M-CSF-R korreliert mit der miR-21-Expression. Die Wechselwirkung ist als indirekt zu betrachten. Ein weiterer Faktor scheint dazwischen geschaltet zu sein, der die direkt wirkende Komponente darstellt. Vermutlich ist dieser Faktor das Onco-Protein Ski. Die miR-21 besitzt eine putative Bindestelle in der 3'UTR von Ski. Ski ist während der monozytären Differenzierung herunterreguliert; wird also vermutlich durch die miR-21 inhibiert. Ski agiert innerhalb der monozytären Differenzierung überwiegend als Repressor [98, 128, 129]. Ueki et al. zeigen, dass im Modell U937+PMA eine Wechselwirkung zwischen Ski und dem M-CSF-R besteht. Über die Ski-vermittelte PU.1-Inhibierung kommt es zum Erlöschen der PU.1-abhängigen Promotoraktivität des M-CSF-R [103]. Es wäre daher denkbar, dass die miR-21 an der 3'UTR von Ski bindet, wodurch Ski inhibiert würde. Die reprimierende Wirkung von Ski auf die M-CSF-R-Expression würde folglich

gesenkt werden bzw. fehlen, sodass es zum Anstieg der M-CSF-R-Expression käme. Auf diesem Weg wäre eine Regulation der M-CSF-R-Expression durch die miR-21 denkbar. Die Regulation der miR-21 könnte durch den myeloiden Hauptregulator PU.1 geschehen. PU.1 bindet direkt an verschiedenen myeloiden Promotoren [82, 112]. Fujita et al. zeigten die Existenz einer putativen Bindestelle im Promotorbereich der miR-21 sowie die direkte Bindung von PU.1 am Promotor via ChIP und Luciferase-Assay (im Modell HL-60) [110]. Da sich die Modelle U937 und HL-60 stark ähneln, wäre es sehr wahrscheinlich, dass PU.1 auch im Modellsystem U937 am Promotor der miR-21 bindet. Eine regulatorische Wechselwirkung konnte in der vorliegenden Arbeit folgendermaßen gezeigt werden: nach Überexpression von PU.1 erfolgt nach 48h ein signifikanter Anstieg der miR-21-Expression. Das Vorliegen der putativen Bindestelle sowie die adäquate funktionelle Wechselwirkung untermauert die These, dass die miR-21 durch PU.1 direkt reguliert wird (Abbildung 14).

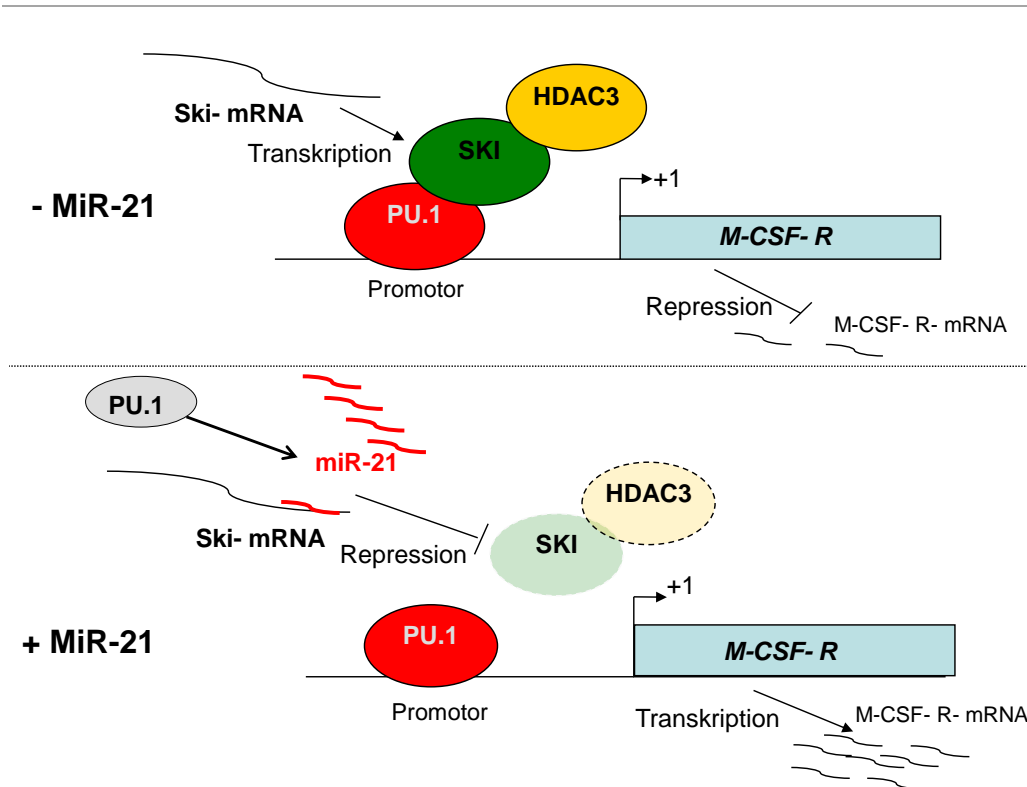


Abbildung 14: Modell des Netzwerkes der Regulation und Funktion der miR-21 in der monozytären Differenzierung im System U937

PU.1 reguliert über Promotorbindung die miR-21- Expression. Die miR-21 bindet dann an der 3'UTR der Ski- mRNA, wodurch diese inhibiert wird. Folglich bleibt die Ski-vermittelte HDAC3- Rekrutierung aus; die PU.1- Funktion am Promotor des M- CSF- R wird gewährleistet, sodass es zur Transkription des M- CSF- R kommt. Die U937- Zellen differenzieren zu Makrophagen und Monozyten.

5.7 Ausblick

Um die direkte funktionelle Interaktion der miR-21 und Ski eindeutig nachzuweisen, müsste die Bindung der miR-21 an der 3'UTR der Ski- mRNA gezeigt werden. Hierzu wäre ein Luciferase- Assay geeignet. Nachfolgend könnte ein Mutagenese- Assay für die 3'UTR von Ski durchgeführt werden, um dann mittels Luciferase- Assay die Bindungsfähigkeit der miR-21 an der mutierten 3'UTR von Ski festzustellen. Um die Regulation der miR-21 durch PU.1 zu beweisen, wäre ein ChiP- Assay (Chromatin- Immuno- Präzipitation) eine Möglichkeit. Damit wäre die Bindung von PU.1 am Promotor der miR-21 eindeutig zu zeigen. Um die Funktionalität dieser Wechselwirkung zu prüfen, wäre die Untersuchung einer PU.1- Blockade (z.B. mittels siRNA) auf die miR-21- Expression interessant.

6 Literaturverzeichnis

- [1] S. J. Morrison, N. Uchida und I. L. Weissman (1995), „The biology of hematopoietic stem cells“, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*.
- [2] M. Kondo, I. L. Weissman, und K. Akashi (1997), „Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow“, *Cell*
- [3] M. Kondo, A. J. Wagers, M. G. Manz, S. S. Prohaska, D. C. Scherer, G. F. Beilhack, J. A. Shizuru, und I. L. Weissman (2003), „Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application“, *Annu. Rev. Immunol.*
- [4] M. Ogawa (1993), „Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells“, *Blood*
- [5] M. Osawa, K. Hanada, H. Hamada, und H. Nakauchi (1996), „Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell“, *Science*
- [6] I. L. Weissman, D. J. Anderson, und F. Gage (2001), „Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations“, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*
- [7] J. L. Christensen und I. L. Weissman (2001), „Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- [8] K. Akashi, D. Traver, T. Miyamoto, und I. L. Weissman (2000), „A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages“, *Nature*
- [9] Y. Arinobu, H. Iwasaki, M. F. Gurish, S. Mizuno, H. Shigematsu, H. Ozawa, D. G. Tenen, K. F. Austen, und K. Akashi (2005), „Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
- [10] D. K. Fogg, C. Sibon, C. Miled, S. Jung, P. Aucouturier, D. R. Littman, A. Cumano, und F. Geissmann (2006), „A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells“, *Science*
- [11] A. Keikawus, H.-W. Baenkler, C. Bieber, R. Brandt, und C. Tushar, *Duale Reihe. Innere Medizin*, 3. Auflage. Thieme, 2012.
- [12] G. Herold, *Innere Medizin*. 2011.
- [13] J. Chen (2011), „Hematopoietic stem cell development, aging and functional failure“, *Int. J. Hematol.*
- [14] A. H. F. M. Peters und J. Schwaller (2011), „Epigenetic mechanisms in acute myeloid leukemia“, *Prog Drug Res.*
- [15] M. Classen, V. Diehl, und K. Kochsiek, *Innere Medizin*, 5. Auflage. Urban und Fischer, 2003.
- [16] E. Wattel, C. Preudhomme, B. Hecquet, M. Vanrumbeke, B. Quesnel, I. Dervite, P. Morel, und P. Fenaux (1994), „p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies“, *Blood*
- [17] G. Cammarata, L. Augugliaro, D. Salemi, C. Agueli, M. La Rosa, L. Dagnino, G. Civiletto, F. Messina, A. Marfia, M. G. Bica, L. Cascio, P. M. Florida, A. M. Mineo, M. Russo, F. Fabbiano, und A. Santoro (2010), „Differential expression of specific microRNA and their targets in acute myeloid leukemia“, *Am. J. Hematol.*
- [18] J. Bäsecke, M. Schwieger, F. Griesinger, B. Schiedlmeier, G. Wulf, L. Trümper, und C. Stocking (2005), „AML1/ETO promotes the maintenance of early hematopoietic progenitors in NOD/SCID mice but does not abrogate their lineage specific differentiation“, *Leuk. Lymphoma*

- [19] K. Petrie und A. Zelent (2007), „AML1/ETO, a promiscuous fusion oncoprotein“, *Blood*
- [20] R. K. Vangala, M. S. Heiss-Neumann, J. S. Rangatia, S. M. Singh, C. Schoch, D. G. Tenen, W. Hiddemann, und G. Behre (2003), „The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia“, *Blood*
- [21] D. F. Claxton, P. Liu, H. B. Hsu, P. Marltou, J. Hester, F. Collins, A. B. Deisseroth, J. D. Rowley, und M. J. Siciliano (1994), „Detection of fusion transcripts generated by the inversion 16 chromosome in acute myelogenous leukemia“, *Blood*
- [22] H. Poirel, I. Radford-Weiss, K. Rack, X. Troussard, A. Veil, F. Valensi, F. Picard, M. Guesnu, D. Leboeuf, und J. Melle (1995), „Detection of the chromosome 16 CBF beta-MYH11 fusion transcript in myelomonocytic leukemias“, *Blood*
- [23] S. M. Hart und L. Foroni (2002), „Core binding factor genes and human leukemia“, *Haematologica*
- [24] S. A. Shurtleff, S. Meyers, S. W. Hiebert, S. C. Raimondi, D. R. Head, C. L. Willman, S. Wolman, M. L. Slovak, A. J. Carroll, und F. Behm (1995), „Heterogeneity in CBF beta/MYH11 fusion messages encoded by the inv(16)(p13q22) and the t(16;16)(p13;q22) in acute myelogenous leukemia“, *Blood*
- [25] S. Allford, D. Grimwade, S. Langabeer, E. Duprez, A. Saurin, S. Chatters, H. Walker, P. Roberts, J. Rogers, B. Bain, K. Patterson, A. McKernan, P. Freemont, E. Solomon, A. Burnett, A. Goldstone, und D. Linch (1999), „Identification of the t(15;17) in AML FAB types other than M3: evaluation of the role of molecular screening for the PML/RARalpha rearrangement in newly diagnosed AML. The Medical Research Council (MRC) Adult Leukaemia Working Party“, *Br. J. Haematol.*
- [26] A. Melnick und J. D. Licht (1999), „Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia“, *Blood*
- [27] J. M. Bennett, D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick, und C. Sultan (1976), „Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group“, *Br. J. Haematol.*
- [28] A. Del Bufalo, J. Bernad, C. Dardenne, D. Verda, J. R. Meunier, F. Rousset, S. Martinozzi-Teissier, und B. Pipy (2011), „Contact sensitizers modulate the arachidonic acid metabolism of PMA-differentiated U-937 monocytic cells activated by LPS“, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*
- [29] K. Kang, H. Jung, S. Nam, und J.-S. Lim (2011), „NDRG2 Promotes GATA-1 Expression through Regulation of the JAK2/STAT Pathway in PMA-stimulated U937 Cells“, *Immune Netw*
- [30] K. Paulsen, S. Tauber, J. Timm, N. Goelz, C. Dumrese, A. Stolzing, R. Hass, und O. Ullrich (2011), „The cannabinoid receptors agonist WIN55212-2 inhibits macrophageal differentiation and alters expression and phosphorylation of cell cycle control proteins“, *Cell Commun. Signal*
- [31] M. Vongsakul, J. Kasisith, P. Noisumdaeng, und P. Puthavathana (2011), „The difference in IL-1beta, MIP-1alpha, IL-8 and IL-18 production between the infection of PMA activated U937 cells with recombinant vaccinia viruses inserted 2004 H5N1 influenza HA genes and NS genes“, *Asian Pac. J. Allergy Immunol.*
- [32] M. Castagna, Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa, und Y. Nishizuka (1982), „Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters“, *J. Biol. Chem.*
- [33] K. Kaibuchi, Y. Fukumoto, N. Oku, Y. Takai, K. Arai, und M. Muramatsu (1989), „Molecular genetic analysis of the regulatory and catalytic domains of protein kinase C“, *J. Biol. Chem.*

- [34] F. Hucho und K. Buchner (1997), „Signal transduction and protein kinases: the long way from the plasma membrane into the nucleus“, *Naturwissenschaften*
- [35] D. M. Berry, R. Antochi, M. Bhatia, und K. A. Meckling-Gill (1996), „1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates expression and translocation of protein kinase Calpha and Cdelta via a nongenomic mechanism and rapidly induces phosphorylation of a 33-kDa protein in acute promyelocytic NB4 cells“, *J. Biol. Chem.*
- [36] W. Kolch, G. Heidecker, G. Kochs, R. Hummel, H. Vahidi, H. Mischak, G. Finkenzeller, D. Marmé, und U. R. Rapp (1993), „Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation“, *Nature*
- [37] J. W. Larrick, D. G. Fischer, S. J. Anderson, und H. S. Koren (1980), „Characterization of a human macrophage-like cell line stimulated in vitro: a model of macrophage functions“, *J. Immunol.*
- [38] L. K. Price, H. U. Choi, L. Rosenberg, und E. R. Stanley (1992), „The predominant form of secreted colony stimulating factor-1 is a proteoglycan“, *J. Biol. Chem.*
- [39] E. R. Stanley und P. M. Heard (1977), „Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells“, *J. Biol. Chem.*
- [40] F. J. Pixley und E. R. Stanley (2004), „CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action“, *Trends Cell Biol.*
- [41] E. R. Stanley, K. L. Berg, D. B. Einstein, P. S. Lee, F. J. Pixley, Y. Wang, und Y. G. Yeung (1997), „Biology and action of colony--stimulating factor-1“, *Mol. Reprod. Dev.*
- [42] L. Van Wesenbeeck, P. R. Odgren, C. A. MacKay, M. D'Angelo, F. F. Safadi, S. N. Popoff, W. Van Hul, und S. C. Marks Jr (2002), „The osteopetrotic mutation toothless (tl) is a loss-of-function frameshift mutation in the rat *Csf1* gene: Evidence of a crucial role for CSF-1 in osteoclastogenesis and endochondral ossification“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
- [43] N. L. Harris, E. S. Jaffe, J. Diebold, G. Flandrin, H. K. Muller-Hermelink, J. Vardiman, T. A. Lister, und C. D. Bloomfield (1999), „World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997“, *J. Clin. Oncol.*
- [44] R. J. Tushinski und E. R. Stanley (1983), „The regulation of macrophage protein turnover by a colony stimulating factor (CSF-1)“, *J. Cell. Physiol.*
- [45] R. J. Tushinski, I. T. Oliver, L. J. Guilbert, P. W. Tynan, J. R. Warner, und E. R. Stanley (1982), „Survival of mononuclear phagocytes depends on a lineage-specific growth factor that the differentiated cells selectively destroy“, *Cell*
- [46] C. A. Boocock, G. E. Jones, E. R. Stanley, und J. W. Pollard (1989), „Colony-stimulating factor-1 induces rapid behavioural responses in the mouse macrophage cell line, BAC1.2F5“, *J. Cell. Sci.*
- [47] P. E. Cohen, L. Zhu, K. Nishimura, und J. W. Pollard (2002), „Colony-Stimulating Factor 1 Regulation of Neuroendocrine Pathways that Control Gonadal Function in Mice“, *Endocrinology*
- [48] Y.-G. Yeung und E. R. Stanley (2003), „Proteomic approaches to the analysis of early events in colony-stimulating factor-1 signal transduction“, *Mol. Cell Proteomics*
- [49] C. J. Sherr, M. F. Roussel, und C. W. Rettenmier (1988), „Colony-stimulating factor-1 receptor (c-fms)“, *J. Cell. Biochem.*
- [50] C. Bourgin, R. P. Bourette, S. Arnaud, Y. Liu, L. R. Rohrschneider, und G. Mouchiroud (2002), „Induced expression and association of the Mona/Gads adapter and Gab3 scaffolding protein during monocyte/macrophage differentiation“, *Mol. Cell. Biol.*

- [51] R. P. Bourette und L. R. Rohrschneider (2000), „Early events in M-CSF receptor signaling“, *Growth Factors*
- [52] K. Kasashima, Y. Nakamura, und T. Kozu (2004), „Altered expression profiles of microRNAs during TPA-induced differentiation of HL-60 cells“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
- [53] A. Chen, M. Luo, G. Yuan, J. Yu, T. Deng, L. Zhang, Y. Zhou, K. Mitchelson, und J. Cheng (2008), „Complementary analysis of microRNA and mRNA expression during phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA)-induced differentiation of HL-60 cells“, *Biotechnol. Lett.*
- [54] U. Testa, C. Fossati, P. Samoggia, R. Masciulli, G. Mariani, H. J. Hassan, N. M. Sposi, R. Guerriero, V. Rosato, M. Gabbianelli, E. Pelosi, M. Valtieri, und C. Peschle (1996), „Expression of growth factor receptors in unilineage differentiation culture of purified hematopoietic progenitors“, *Blood*
- [55] N. Haran-Ghera, R. Krautghamer, T. Lapidot, A. Peled, M. G. Dominguez, und E. R. Stanley (1997), „Increased circulating colony-stimulating factor-1 (CSF-1) in SJL/J mice with radiation-induced acute myeloid leukemia (AML) is associated with autocrine regulation of AML cells by CSF-1“, *Blood*
- [56] W. M. Roberts, L. H. Shapiro, R. A. Ashmun, und A. T. Look (1992), „Transcription of the human colony-stimulating factor-1 receptor gene is regulated by separate tissue-specific promoters“, *Blood*
- [57] S. A. Ridge, M. Worwood, D. Oscier, A. Jacobs, und R. A. Padua (1990), „FMS mutations in myelodysplastic, leukemic, and normal subjects“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
- [58] M. G. Cecchini, M. G. Dominguez, S. Mocci, A. Wetterwald, R. Felix, H. Fleisch, O. Chisholm, W. Hofstetter, J. W. Pollard, und E. R. Stanley (1994), „Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse“, *Development*
- [59] P. E. Cohen, K. Nishimura, L. Zhu, und J. W. Pollard (1999), „Macrophages: important accessory cells for reproductive function“, *J. Leukoc. Biol.*
- [60] X.-M. Dai, G. R. Ryan, A. J. Hapel, M. G. Dominguez, R. G. Russell, S. Kapp, V. Sylvestre, und E. R. Stanley (2002), „Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects“, *Blood*
- [61] D. P. Bartel (2004), „MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function“, *Cell*
- [62] M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, W. Lendeckel, und T. Tuschl (2001), „Identification of novel genes coding for small expressed RNAs“, *Science*
- [63] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, und V. Ambros (1993), „The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*“, *Cell*
- [64] H. K. Saini, S. Griffiths-Jones, und A. J. Enright (2007), „Genomic analysis of human microRNA transcripts“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
- [65] X. Liu, K. Fortin, und Z. Mourelatos (2008), „MicroRNAs: biogenesis and molecular functions“, *Brain Pathol.*
- [66] T. G. McDaneld (2009), „MicroRNA: mechanism of gene regulation and application to livestock“, *J. Anim. Sci.*
- [67] A. J. Giraldez, Y. Mishima, J. Rihel, R. J. Grocock, S. Van Dongen, K. Inoue, A. J. Enright, und A. F. Schier (2006), „Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs“, *Science*
- [68] B. Wightman, I. Ha, und G. Ruvkun (1993), „Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*“, *Cell*

- [69] R. Garzon, S. Volinia, C.-G. Liu, C. Fernandez-Cymering, T. Palumbo, F. Pichiorri, M. Fabbri, K. Coombes, H. Alder, T. Nakamura, N. Flomenberg, G. Marcucci, G. A. Calin, S. M. Kornblau, H. Kantarjian, C. D. Bloomfield, M. Andreeff, und C. M. Croce (2008), „MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia“, *Blood*
- [70] S. M. Johnson, H. Grosshans, J. Shingara, M. Byrom, R. Jarvis, A. Cheng, E. Labourier, K. L. Reinert, D. Brown, und F. J. Slack (2005), „RAS is regulated by the let-7 microRNA family“, *Cell*
- [71] B. Boyerinas, S.-M. Park, N. Shomron, M. M. Hedegaard, J. Vinther, J. S. Andersen, C. Feig, J. Xu, C. B. Burge, und M. E. Peter (2008), „Identification of let-7-regulated oncofetal genes“, *Cancer Res.*
- [72] Y. S. Lee und A. Dutta (2007), „The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene“, *Genes Dev.*
- [73] N. Dahiya, C. A. Sherman-Baust, T.-L. Wang, B. Davidson, I.-M. Shih, Y. Zhang, W. Wood 3rd, K. G. Becker, und P. J. Morin (2008), „MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer“, *PLoS ONE*
- [74] J. Takamizawa, H. Konishi, K. Yanagisawa, S. Tomida, H. Osada, H. Endoh, T. Harano, Y. Yatabe, M. Nagino, Y. Nimura, T. Mitsudomi, und T. Takahashi (2004), „Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival“, *Cancer Res.*
- [75] F. Yu, H. Yao, P. Zhu, X. Zhang, Q. Pan, C. Gong, Y. Huang, X. Hu, F. Su, J. Lieberman, und E. Song (2007), „let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells“, *Cell*
- [76] J. A. Pulikkan, V. Dengler, P. S. Peramangalam, A. A. Peer Zada, C. Müller-Tidow, S. K. Bohlander, D. G. Tenen, und G. Behre (2010), „Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia“, *Blood*
- [77] M. V. Iorio, M. Ferracin, C.-G. Liu, A. Veronese, R. Spizzo, S. Sabbioni, E. Magri, M. Pedriali, M. Fabbri, M. Campiglio, S. Ménard, J. P. Palazzo, A. Rosenberg, P. Musiani, S. Volinia, I. Nenci, G. A. Calin, P. Querzoli, M. Negrini, und C. M. Croce (2005), „MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer“, *Cancer Res.*
- [78] M. V. Iorio, R. Visone, G. Di Leva, V. Donati, F. Petrocca, P. Casalini, C. Taccioli, S. Volinia, C.-G. Liu, H. Alder, G. A. Calin, S. Ménard, und C. M. Croce (2007), „MicroRNA signatures in human ovarian cancer“, *Cancer Res.*
- [79] W.-O. Lui, N. Pourmand, B. K. Patterson, und A. Fire (2007), „Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer“, *Cancer Res.*
- [80] I. A. Asangani, S. A. K. Rasheed, D. A. Nikolova, J. H. Leupold, N. H. Colburn, S. Post, und H. Allgayer (2008), „MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer“, *Oncogene*
- [81] F. Meng, R. Henson, H. Wehbe-Janek, K. Ghoshal, S. T. Jacob, und T. Patel (2007), „MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer“, *Gastroenterology*
- [82] S. Volinia, G. A. Calin, C.-G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R. L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C. C. Harris, und C. M. Croce (2006), „A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
- [83] Y. Hu, A. M. Correa, A. Hoque, B. Guan, F. Ye, J. Huang, S. G. Swisher, T. T. Wu, J. A. Ajani, und X.-C. Xu (2011), „Prognostic significance of differentially expressed miRNAs in esophageal cancer“, *Int. J. Cancer*

- [84] L. B. Frankel, N. R. Christoffersen, A. Jacobsen, M. Lindow, A. Krogh, und A. H. Lund (2008), „Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells“, *J. Biol. Chem.*
- [85] A. M. Krichevsky und G. Gabriely (2009), „miR-21: a small multi-faceted RNA“, *J. Cell. Mol. Med.*
- [86] M. J. Klemsz, S. R. McKercher, A. Celada, C. Van Beveren, und R. A. Maki (1990), „Pillars article: the macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell*
- [87] H. Iwasaki, C. Somoza, H. Shigematsu, E. A. Duprez, J. Iwasaki-Arai, S.-I. Mizuno, Y. Arinobu, K. Geary, P. Zhang, T. Dayaram, M. L. Fenyus, S. Elf, S. Chan, P. Kastner, C. S. Huettner, R. Murray, D. G. Tenen, und K. Akashi (2005), „Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation“, *Blood*
- [88] P. Kastner und S. Chan (2008), „PU.1: a crucial and versatile player in hematopoiesis and leukemia“, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*
- [89] H. L. Pahl, R. J. Scheibe, D. E. Zhang, H. M. Chen, D. L. Galson, R. A. Maki, und D. G. Tenen (1993), „The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter“, *J. Biol. Chem.*
- [90] S. Gallant und G. Gilkeson (2006), „ETS transcription factors and regulation of immunity“, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*
- [91] J. Back, D. Allman, S. Chan, und P. Kastner (2005), „Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis“, *Exp. Hematol.*
- [92] E. W. Scott, M. C. Simon, J. Anastasi, und H. Singh (1994), „Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages“, *Science*
- [93] C. Nerlov, E. Querfurth, H. Kulesa, und T. Graf (2000), „GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription“, *Blood*
- [94] N. Nomura, S. Sasamoto, S. Ishii, T. Date, M. Matsui, und R. Ishizaki (1989), „Isolation of human cDNA clones of ski and the ski-related gene, sno“, *Nucleic Acids Res.*
- [95] J. Deheuninck und K. Luo (2009), „Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF-beta signaling“, *Cell Res.*
- [96] M. Fukuchi, M. Nakajima, Y. Fukai, T. Miyazaki, N. Masuda, M. Sohda, R. Manda, K. Tsukada, H. Kato, und H. Kuwano (2004), „Increased expression of c-Ski as a co-repressor in transforming growth factor-beta signaling correlates with progression of esophageal squamous cell carcinoma“, *Int. J. Cancer*
- [97] J. A. Reed, Q. Lin, D. Chen, I. S. Mian, und E. E. Medrano (2005), „SKI pathways inducing progression of human melanoma“, *Cancer Metastasis Rev.*
- [98] R. Dahl, M. Kieslinger, H. Beug, und M. J. Hayman (1998), „Transformation of hematopoietic cells by the Ski oncoprotein involves repression of retinoic acid receptor signaling“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
- [99] M. Ritter, D. Kattmann, S. Teichler, O. Hartmann, M. K. R. Samuelsson, A. Burchert, J.-P. Bach, T. D. Kim, B. Berwanger, C. Thiede, R. Jäger, G. Ehninger, H. Schäfer, N. Ueki, M. J. Hayman, M. Eilers, und A. Neubauer (2006), „Inhibition of retinoic acid receptor signaling by Ski in acute myeloid leukemia“, *Leukemia*
- [100] K. Luo (2004), „Ski and SnoN: negative regulators of TGF-beta signaling“, *Curr. Opin. Genet. Dev.*
- [101] T. Shinagawa, T. Nomura, C. Colmenares, M. Ohira, A. Nakagawara, und S. Ishii (2001), „Increased susceptibility to tumorigenesis of ski-deficient heterozygous mice“, *Oncogene*

- [102] C. D. Schweighofer, K. R. Coombes, L. L. Barron, L. Diao, R. J. Newman, A. Ferrajoli, S. O'Brien, W. G. Wierda, R. Luthra, L. J. Medeiros, M. J. Keating, und L. V. Abruzzo (2011), „A Two-Gene Signature, SKI and SLAMF1, Predicts Time-to-Treatment in Previously Untreated Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia“, PLoS One
- [103] N. Ueki, L. Zhang, M. J. Hayman, und M. J. Haymann (2008), „Ski can negatively regulates macrophage differentiation through its interaction with PU.1“, *Oncogene*
- [104] N. Ueki, L. Zhang, und M. J. Hayman (2004), „Ski negatively regulates erythroid differentiation through its interaction with GATA1“, *Mol. Cell. Biol.*
- [105] K. J. Livak und T. D. Schmittgen (2001), „Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method“, *Methods*
- [106] A. L. Córbi und C. Lopéz-Rodríguez (1997), „CD11c integrin gene promoter activity during myeloid differentiation“, *Leuk. Lymphoma*
- [107] D. D. Hickstein, J. Ozols, S. A. Williams, J. U. Baenziger, R. M. Locksley, und G. J. Roth (1987), „Isolation and characterization of the receptor on human neutrophils that mediates cellular adherence“, *J. Biol. Chem.*
- [108] B. Schleiffenbaum, R. Moser, M. Patarroyo, und J. Fehr (1989), „The cell surface glycoprotein Mac-1 (CD11b/CD18) mediates neutrophil adhesion and modulates degranulation independently of its quantitative cell surface expression“, *J. Immunol.*
- [109] C. J. Sherr, C. W. Rettenmier, und M. F. Roussel (1988), „Macrophage Colony-stimulating Factor, CSF-1, and Its Proto-oncogene-encoded Receptor“, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*
- [110] S. Fujita, T. Ito, T. Mizutani, S. Minoguchi, N. Yamamichi, K. Sakurai, und H. Iba (2008), „miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism“, *J. Mol. Biol.*
- [111] C. H. Lawrie, S. Soneji, T. Marafioti, C. D. O. Cooper, S. Palazzo, J. C. Paterson, H. Cattan, T. Enver, R. Mager, J. Boulwood, J. S. Wainscoat, und C. S. R. Hatton (2007), „MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma“, *Int. J. Cancer*
- [112] V. Fulci, S. Chiaretti, M. Goldoni, G. Azzalin, N. Carucci, S. Tavolaro, L. Castellano, A. Magrelli, F. Citarella, M. Messina, R. Maggio, N. Peragine, S. Santangelo, F. R. Mauro, P. Landgraf, T. Tuschl, D. B. Weir, M. Chien, J. J. Russo, J. Ju, R. Sheridan, C. Sander, M. Zavolan, A. Guarini, R. Foà, und G. Macino (2007), „Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia“, *Blood*
- [113] M. B. Miranda und D. E. Johnson (2007), „Signal transduction pathways that contribute to myeloid differentiation“, *Leukemia*
- [114] M. Socolovsky, S. N. Constantinescu, S. Bergelson, A. Sirotkin, und H. F. Lodish (1998), „Cytokines in hematopoiesis: specificity and redundancy in receptor function“, *Adv. Protein Chem.*
- [115] M. Petersen und J. Wengel (2003), „LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics“, *Trends Biotechnol.*
- [116] B. Vester und J. Wengel (2004), „LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA“, *Biochemistry*
- [117] R. P. DeKoter, J. C. Walsh, und H. Singh (1998), „PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors“, *EMBO J.*
- [118] S. R. McKercher, B. E. Torbett, K. L. Anderson, G. W. Henkel, D. J. Vestal, H. Baribault, M. Klemsz, A. J. Feeney, G. E. Wu, C. J. Paige, und R. A. Maki (1996), „Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities“, *EMBO J.*

- [119] F. Rosenbauer, B. M. Owens, L. Yu, J. R. Tumang, U. Steidl, J. L. Kutok, L. K. Clayton, K. Wagner, M. Scheller, H. Iwasaki, C. Liu, B. Hackanson, K. Akashi, A. Leutz, T. L. Rothstein, C. Plass, und D. G. Tenen (2006), „Lymphoid cell growth and transformation are suppressed by a key regulatory element of the gene encoding PU.1“, *Nat. Genet.*
- [120] B. U. Mueller, T. Pabst, M. Osato, N. Asou, L. M. Johansen, M. D. Minden, G. Behre, W. Hiddemann, Y. Ito, und D. G. Tenen (2003), „Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia“, *Blood*
- [121] O. C. Farokhzad, C. S. Shelley, und M. A. Arnaout (1996), „Induction of the CD11b gene during activation of the monocytic cell line U937 requires a novel nuclear factor MS-2“, *J. Immunol.*
- [122] Y.-S. Baek, S. Haas, H. Hackstein, G. Bein, M. Hernandez-Santana, H. Lehrach, S. Sauer, und H. Seitz (2009), „Identification of novel transcriptional regulators involved in macrophage differentiation and activation in U937 cells“, *BMC Immunol.*
- [123] R. Handin, S. Lux, T. Stossel „Principles and Practice of Hematology“, *Blood*
- [124] B. Fuhrman, A. Partoush, N. Volkova, und M. Aviram (2008), „Ox-LDL induces monocyte-to-macrophage differentiation in vivo: Possible role for the macrophage colony stimulating factor receptor (M-CSF-R)“, *Atherosclerosis*
- [125] J. A. Chan, A. M. Krichevsky, und K. S. Kosik (2005), „MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells“, *Cancer Res.*
- [126] L. B. Frankel, N. R. Christoffersen, A. Jacobsen, M. Lindow, A. Krogh, und A. H. Lund (2008), „Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells“, *J. Biol. Chem.*
- [127] H. B. Houbaviy, M. F. Murray, und P. A. Sharp (2003), „Embryonic stem cell-specific MicroRNAs“, *Dev. Cell*
- [128] M. Ritter, D. Kattmann, S. Teichler, O. Hartmann, M. K. R. Samuelsson, A. Burchert, J.-P. Bach, T. D. Kim, B. Berwanger, C. Thiede, R. Jäger, G. Ehninger, H. Schäfer, N. Ueki, M. J. Hayman, M. Eilers, und A. Neubauer (2006), „Inhibition of retinoic acid receptor signaling by Ski in acute myeloid leukemia“, *Leukemia*
- [129] S. Teichler, R. F. Schlenk, K. Strauch, N. M. Hagner, M. Ritter, und A. Neubauer (2008), „Expression of the nuclear oncogene Ski in patients with acute myeloid leukemia treated with all-trans retinoic acid“, *Haematologica*
- [130] R. Riccioni, E. Saulle, S. Miliati, N. M. Sposi, M. Gualtieri, N. Mauro, M. Mancini, D. Diverio, F. Lo Coco, C. Peschle, und U. Testa (2003), „C-fms expression correlates with monocytic differentiation in PML-RAR alpha+ acute promyelocytic leukemia“, *Leukemia*
- [131] G. Behre, A. J. Whitmarsh, M. P. Coghlan, T. Hoang, C. L. Carpenter, D. E. Zhang, R. J. Davis, und D. G. Tenen (1999), „c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor“, *J. Biol. Chem.*

7 Thesen

1. Die miR-21 wurde bisher hauptsächlich als miR mit onkogenem Potential beschrieben. Ihre funktionellen und regulatorischen Aspekte innerhalb der myeloiden Differenzierung sind aktuell weitgehend unklar.
2. U937- Zellen sind histiozytäre Lymphomzellen, die nach Stimulation mit PMA zu Monozyten und Makrophagen differenzieren können. U937+PMA gilt als etabliertes Modellsystem der monozytären Differenzierung.
3. Das Modell U937+PMA wurde verifiziert, indem die Expression verschiedener myeloider Marker, z.B. CD11b und M- CSF- R bestimmt bzw. die Veränderungen in der Zellmorphologie kontrolliert wurden. Während der myeloiden Differenzierung erfolgt ein Expressionsanstieg von CD11b und M- CSF- R sowie die Ausbildung eines monozytären Phänotyps.
4. Während der myeloiden Differenzierung kommt es zu einer Veränderung im microRNA- Expressionsprofil, u.a. auch zum Anstieg der Expression der miR-21.
5. Das OnkoProtein Ski kann als direktes funktionelles Ziel der miR-21 angenommen werden. Unterstützt wird diese These durch das Vorliegen einer putativen Bindestelle der miR-21 innerhalb der 3'UTR der Ski- mRNA sowie der Expressionsabnahme der Ski- mRNA innerhalb der myeloiden Differenzierung.
6. Zwischen der miR-21 und dem M- CSF- R scheint eine indirekte Wechselwirkung vorzuliegen, was durch folgende Daten unterstützt wird: innerhalb der monozytären Differenzierung kommt es zum gleichgerichteten Anstieg der Expression der miR-21 und des M- CSF- R. Nach Überexpression bzw. Blockade der miR-21 mittels Plasmid bzw. LNA konnte ein äquivalenter Anstieg bzw. Abfall der Expression der mRNA des M- CSF- R nachgewiesen werden.

7. Eine konkrete Wechselwirkung zwischen Ski und M- CSF- R konnte im Modellsystem U937 gezeigt werden [103].
8. Die Regulation der miR-21 wird wahrscheinlich durch den myeloiden TF PU.1 gesteuert. Diese These wird unterstützt durch den gleichgerichteten Anstieg der miR-21 und des TF PU.1 während der monozytären Differenzierung sowie den Anstieg der Expression der miR-21 nach Überexpression von PU.1 mittels Plasmid.
9. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die bisher nur als OncomiR bekannte miR-21 als wichtiges Element innerhalb der myeloiden Differenzierung zu betrachten ist. Die miR-21 wird durch den myeloiden Masterregulator PU.1 reguliert. Weiterhin übt sie funktionell eine inhibitorische Wirkung auf das proliferativ- wirkende OnkoProtein Ski und darüber einen aktivierenden Effekt auf ihr myeloides Ziel, den M- CSF- R, aus. Es scheint ein regulatorischer Loop zwischen PU.1, der miR-21, Ski und dem M- CSF- R zu bestehen.

Curriculum Vitæ

Persönliche Angaben

Name: Maria Lehretz

Adresse/ Kontakt: Ernst- Grube- Straße 1
06120 Halle
0345 135 27 84
maria_lehretz@yahoo.de

Geburt: 09. November 1985
in Köthen (Anhalt)

Berufliche Aktivitäten

Assistenzärztin Psycho- St. Elisabeth und St. Barbara Halle (Saale)
somatik und
Psychotherapie
seit November 2012

Ausbildung

Studium Humanmedizin Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Oktober 2005 – Mai 2012 Physikum: 09/2007 Note: 2,5
Staatsexamen: 05/2012 Note: 2,5

Beginn Promotion Universitätsklinikum Kröllwitz, Klinik für Innere
Juli 2008 Medizin IV/ Hämatologie und Onkologie
Thema: Funktionelle und regulatorische Analysen
zur miR-21 im myeloiden Differenzierungsmodell
U937

Allgemeine Hochschulreife/ Gymnasium „An der Rüsternbreite“
Abitur Note: 1,0
August 1996 – Juli 2005

Ort, Datum

Unterschrift

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades „Dr. med.“ selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift

Erklärung über frühere Promotionsversuche

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

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Nach Abschluss der vorliegenden Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die mich seit dem 7. Semester während der Durchführung und Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schmoll, Direktor der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV an der MLU Halle-Wittenberg für die Möglichkeit der Durchführung meiner Dissertation an seiner Klinik, für die Bereitstellung von Räumlichkeiten und Geräten sowie für die Betreuung bis zum Abschluss meiner Arbeit.

Ich bedanke mich bei Herrn Dipl.- Biol. Dennis Gerloff für seine praktische Anleitung und fachliche Führung. Selbstverständlich auch dafür, dass er stets den Überblick über das Projekt behalten und mich immer wieder an den Unterschied zwischen Fakten und Vermutungen erinnert hat. Und dafür, dass er mich trotz Enttäuschungen nach fehlgeschlagenen Experimenten immer wieder motiviert und an meinen Ehrgeiz appelliert hat, durchzuhalten, Literaturrecherche zu betreiben und das Experiment zu wiederholen. Sein meist gesagtes Wort: „Nochmal.“ Offensichtlich hat es geholfen- die Arbeit ist fertig, und ihm gebührt für sein Engagement und die Nerven, die er bei der Arbeit mit mir gelassen hat, großer Respekt.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden, die mir Unterstützung und Kraft zum Durchhalten gegeben haben. Und zuletzt, aber am allermeisten danke ich meinem Mann, zugleich bestem Freund und Vater unseres ungeborenen Kindes, Herrn Dipl.- Biochem. David Ulbricht. Vielen Dank, dass du dir meine Klagen angehört, mich motiviert und zum Fertigstellen der Arbeit angetrieben hast. Und erst recht dafür, dass du mir bei fachlichen Fragen stets zur Seite standest und mir geholfen hast, wo du nur konntest, auch, wenn du selbst genug zu tun hattest. Wir sind privat als auch beruflich ein super Team- ich wünsche mir, dass das noch für sehr lange Zeit so bleiben wird. Und ich hoffe, ich kann dir bei deiner Promotion ebenso den Rücken stärken wie du das bei mir tatest.