

Die Rolle der C/EBP α -regulierten microRNA-30c in der Granulopoese und der akuten myeloischen Leukämie

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Christiane Katzerke

geb. am 19.08.1981 in Halle (Saale)

Gutachter: 1. Prof. Dr. Sven-Erik Behrens

2. Prof. Dr. Gerhard Behre

3. Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier

eingereicht am 15.12.2014

öffentliche Verteidigung am 13.07.2015

*Das Wichtigste ist, dass man als Erster eine Idee hat und sie mit Leidenschaft
umsetzt.*

Luciano Benetton

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis	11
1 Einleitung	12
1.1 Hämatopoese	12
1.2 Leukämie	14
1.3 Akute myeloische Leukämie	15
1.4 CCAAT / enhancer-binding Proteine (C/EBPs).....	16
1.4.1 CCAAT / enhancer-binding protein α	17
1.4.2 C/EBP α in der Hämatopoese	18
1.4.3 C/EBP α in der Leukämogenese	19
1.5 Notch1	20
1.6 miRNA	22
1.6.1 Biogenese und Funktionsweise	23
1.6.2 miRNAs in der Hämatopoese	25
1.6.3 miRNAs und C/EBP α in der Hämatopoese und AML	26
1.6.4 microRNA-30c (miR-30c).....	26
1.7 Zielstellung	27
2 Material und Methoden	29
2.1 Materialien	29
2.1.1 Geräte und Software	29
2.1.2 Reagenzien	30
2.1.3 Biologische Materialien.....	36
2.2 Methoden.....	41
2.2.1 Zellkultur	41
2.2.2 Differenzierung der Zellen	41
2.2.3 Gesamt-RNA-Extraktion	42
2.2.4 Konzentrationsbestimmung der RNA	43
2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
2.2.5.1 Reverse Transkriptase	44

2.2.5.2	Semiquantitative PCR	44
2.2.5.3	Quantitative Real-Time PCR	45
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	46
2.2.7	microRNA-Array	46
2.2.8	Klonierung	47
2.2.9	<i>In-vitro</i> -Mutagenese.....	48
2.2.10	Gewinnung von Plasmiden	48
2.2.11	Transiente Transfektion.....	49
2.2.11.1	Lipofektion mit Lipofectamin TM LTX	49
2.2.11.2	Elektroporation mit AMAXA TM Nucleofector Cell line Kit V	49
2.2.11.3	Calcium-Phosphat-Transfektion	50
2.2.12	Gewinnung des Lentivirus	50
2.2.13	Transduktion der Zellen mit dem Lentivirus	50
2.2.14	Luziferase-Reporter-Assay	51
2.2.15	Durchflusszytometrie (FACS)	51
2.2.16	Proteinbestimmung.....	52
2.2.17	Elektrophoretische Auftrennung der Proteine in einem SDS- Polyacrylamidgel (SDS-PAGE).....	52
2.2.18	Western-Blot.....	53
2.2.19	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	53
2.2.20	Statistische Auswertung	54
3	Ergebnisse	55
3.1	Identifizierung C/EBP α -regulierter miRNAs mittels Microarray	55
3.2	C/EBP α -p42 reguliert die miR-30c während der granulozytären Differenzierung	61
3.3	Expression der miR-30c in AML-Patientenproben.....	65
3.3.1	Expression der miR-30c in verschiedenen AML-Subtypen.....	66
3.3.2	Expression der miR-30c in NK-AML Patientenproben mit <i>CEBPA</i> - Mutationen.....	68
3.4	Expression der miR-30c in vivo	69
3.5	Expression der miR-30c in Knochenmarkszellen induzier-barer C/EBP α -Knockout-Mäuse.....	71
3.6	miR-30c ist ein direktes Ziel von C/EBP α	73

3.7	Notch1 mRNA ist ein direktes Ziel der miR-30c.....	75
3.7.1	Inverse Korrelation von miR-30c Expression und des Notch1-Proteinlevels während der Granulopoese.....	76
3.7.2	Reduktion des Notch1-Proteinlevels nach Überexpression der miR-30c.....	78
3.7.3	Reduktion des Trib2 Proteins durch C/EBP α -p42.....	79
3.7.4	Verifikation von Notch1 als direktes Ziel der miR-30c	80
3.8	Die Rolle der miR-30c für die C/EBP α -vermittelte Notch1-Inhibierung sowie Induktion der myeloide Differenzierung	82
4	Diskussion	85
4.1	Identifizierung C/EBP α -regulierter miRNAs mittels Microarray	86
4.2	miR-30c – ein neues Ziel von C/EBP α in der Granulopoese	88
4.3	Notch1 – neues Ziel der miR-30c	90
4.4	Bedeutung der miR-30c in der AML	94
5	Zusammenfassung.....	98
6	Literaturverzeichnis	100
	Danksagung.....	114
	Selbstständigkeitserklärung	116
	Erklärung über bisherige Promotionsversuche	117
	Lebenslauf	118
	Veröffentlichungen.....	120

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABL	<i>abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1</i>
Ago	<i>argonaute RISC catalytic component</i>
AML	Akute myeloische Leukämie
APL	Akute Promyelozyten-Leukämie
AS	Aminosäuren
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATRA / RA	<i>all-trans-retinoic-acid</i> / Retinolsäure
bp	Basenpaare
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
BR	Basisregion
bZIP	Basisregion mit Leuzin-Zipper
C	Cytosin
CK-AML	AML mit zytogenetisch komplexen Karyotyp
CCD	<i>charge-coupled Device</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
C/EBP	<i>CCAAT Enhancer binding protein</i>
C/EBP α / CEBPA	<i>CCAAT Enhancer binding protein alpha</i>
C/EBP α ^{-/-}	homozygoter C/EBP α Knockout
C/EBP α ^{fl/fl}	C/EBP α Wildtyp
C/EBP β	<i>CCAAT Enhancer binding protein beta</i>
C/EBP γ	<i>CCAAT Enhancer binding protein gamma</i>
C/EBP δ	<i>CCAAT Enhancer binding protein delta</i>
C/EBP ϵ	<i>CCAAT Enhancer binding protein epsilon</i>
C/EBP ζ	<i>CCAAT Enhancer binding protein zeta</i>
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CLP	<i>common lymphoid progenitor</i>
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMP	<i>common myeloid progenitor</i>
CMML	Chronische myelomonozytische Leukämie
C _T	<i>threshold cycle</i>
d	<i>days</i>
DGCR8	<i>DiGeorge critical region 8</i>
DII	<i>Delta-like-Ligands</i>

DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Nukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ETO	<i>Eight-twenty-one</i>
Exp5	Exportin-5
FAB	<i>French-American-British</i>
FACS	<i>fluorescent activated cell sorter</i>
FLT3	<i>fms-related tyrosine kinase 3</i>
FP	<i>forward primer</i>
G	Guanin
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	<i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
GMP	<i>granulocyte-macrophage progenitor</i>
hu	<i>human</i>
h	<i>hours</i>
Hes1	<i>hes family bHLH transcription factor 1</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
inv	Inversion
IP	Immunopräzipitation
ITD	<i>internal tandem duplication</i>
Jag	<i>Jagged-Ligands</i>
KM	Knochenmark
LB	<i>lysogeny broth</i>
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
LSK	Lin ⁻ Sca1 ⁺ cKit ⁺
LZ	<i>leuzin zipper region</i>
M-CSF	<i>macrophage-colony-stimulating factor</i>
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MEP	<i>megacaryocytic-erythroid progenitor</i>
MLL	Münchener Leukämielabor
MPP	<i>multipotent progenitor</i>
miRNA, miR	microRNA

mRNA	<i>messenger RNA</i>
mu	<i>murin</i>
mut	Mutante
MYB	<i>v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog</i>
nt	Nukleotide
NFYC	<i>nuclear transcription factor Y, gamma</i>
NK-AML	AML mit zytogenetisch normalem Karyotyp
NPM1	<i>nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)</i>
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PB	peripheres Blut
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PML	Promyelozyten-Leukämie-Gen
Poly I:C	<i>polyinosinic-polycytidylic acid</i>
pre	<i>precursor</i>
pri	<i>primary</i>
PU.1	<i>Spi-1 proto-oncogene</i>
QPCR	quantitative Real-Time PCR
r	<i>recombinant</i>
RAR α	<i>retinoic acid receptor alpha</i>
RAS	G-Protein Ras (<i>Rat sarcoma</i>)
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RP	<i>reverse primer</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
s-AML	sekundäre AML
snoRNA	<i>small nucleolar ribonucleic acid</i>
t	Translokation
TAD	Transaktivierungsdomäne
T-ALL	Akute lymphatische Leukämie der T-Zellen
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBP	<i>TATA-Box binding protein</i>
TE	Transaktivierungselement
TKD	<i>tyrosine kinase domain</i>
TRBP	<i>TAR RNA-binding protein</i>

Trib2	<i>tribbles pseudokinase 2</i>
U	Uracil
U6	RNU6B = <i>RNA U6 small nuclear 2</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
VP	Viruspartikel
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	Wildtyp

Anmerkungen

Anglizismen sind in dieser Arbeit kursiv dargestellt.

Die in der Fachliteratur allgemein üblichen Abkürzungen für Chemikalien sind nicht im Abkürzungsverzeichnis enthalten (siehe Materialien).

Gebräuchliche Masseinheiten sind nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung der Blut- und Immunzellen im Knochenmark.....	13
Abbildung 2: Aufbau und funktionelle Domänen des C/EBP α Proteins.	18
Abbildung 3: Die Biogenese und Funktionsweise der miRNAs	24
Abbildung 4: Expression von C/EBP α , C/EBP ϵ und GCSFR nach lentiviraler Überexpression von C/EBP α	56
Abbildung 5: Vergleich der Ergebnisse von MicroRNA Array und quantitativer Real-Time PCR nach lentiviraler Überexpression von C/EBP α	60
Abbildung 6: Induktion der miR-30c und miR-223 durch lentivirale Überexpression von C/EBP α in K562 Zellen.....	61
Abbildung 7: Induktion der miR-30c durch C/EBP α -p42.....	63
Abbildung 8: Induktion der miR-30c durch ATRA- und G-CSF-induzierte granulozytäre Differenzierung	65
Abbildung 9: Reduzierte Expression der miR-30c in verschiedenen Subgruppen der AML	67
Abbildung 10: Reduzierte Expression der miR-30c in NK-AML Patientenproben mit <i>CEBPA</i> -Mutationen	69
Abbildung 11: Expression der miR-30c in verschiedenen gesorteten Vorläuferzellen und reifen Granulozyten aus dem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen.....	70
Abbildung 12: Reduzierte Expression der miR-30c in Knochenmarkszellen von induzierbaren C/EBP α -Knockout-Mäusen.....	72
Abbildung 13: Potentielle C/EBP α -Bindestellen im Minimalpromotorbereich der MICRORNA-30c-Gene.....	73
Abbildung 14: miR-30c ist ein direktes Ziel von C/EBP α	74
Abbildung 15: Potentielle Bindestelle der miR-30c in der 3'UTR von <i>NOTCH1</i> ...	76
Abbildung 16: Reduktion des Notch1 Proteins durch C/EBP α -p42	77
Abbildung 17: Reduktion des Notch1 Proteins während der G-CSF-induzierten Granulozytendifferenzierung	78
Abbildung 18: Reduktion des Notch1 Proteins durch Überexpression der miR-30c.....	79
Abbildung 19: Reduktion von Trib2 durch C/EBP α -p42.....	80

Abbildung 20: Potentielle sowie mutierte Bindestelle der miR-30c in der 3'UTR von <i>NOTCH1</i>	81
Abbildung 21: Luziferase-Assay	82
Abbildung 22: miR-30c ist notwendig für C/EBP α um Notch1 zu blocken	83
Abbildung 23: miR-30c ist notwendig für C/EBP α um die myeloide Differenzierung zu induzieren.....	84
Abbildung 24: Model des Netzwerkes von C/EBP α , miR-30c und Notch1 während der Granulopoese und AML	94

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: FAB-Klassifikation.....	15
Tabelle 2: Genetische und morphologische Charakterisierung von AML-Patienten.....	39
Tabelle 3: Genetische und morphologische Charakterisierung von NK-AML Patienten mit <i>CEBPA</i> -Mutation und <i>CEBPA</i> -Wildtyp.....	40
Tabelle 4: Expression von C/EBP α -regulierten miRNAs	57

1 Einleitung

1.1 Hämatopoese

Die Hämatopoese beschreibt einen dynamischen und hoch komplexen Prozess mit mehreren hierarchisch organisierten Zwischenschritten der Entwicklung von der hämatopoetische Stammzelle (HSC) zu den ausdifferenzierten, funktionellen peripheren Blutzellen. Die Proliferationsfähigkeit der Zellen nimmt dabei mit zunehmender Differenzierung ab. Die Differenzierung bzw. Reifung von hämatopoetischen Stammzellen führt zu aufeinanderfolgenden entwicklungsbeschränkten Stadien. Zuerst entwickeln sich die pluripotenten HSCs zu verschiedenen multipotenten Vorläuferzellen (MPP), welche die Fähigkeit der Selbsterneuerung verloren haben, aber noch immer das Differenzierungspotenzial für alle Linien besitzen. Die determinierten MPPs können zu gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzellen (CLP) und gemeinsamen myeloischen Vorläuferzellen (CMP) differenzieren. Über linienspezifische Vorläuferzellen bilden sich aus den CLPs reife B- und T-Lymphozyten sowie natürliche Killerzellen. Die CMPs führen zu Granulozyten-Makrophagen Vorläufern (GMP), welche zu Monozyten/ Makrophagen und Granulozyten differenzieren, und Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläufern (MEP), welche zu Megakaryozyten bzw. Thrombozyten und Erythrozyten differenzieren ¹⁻².

Mit zunehmender Differenzierung und dem damit verbundenen Verlust der Proliferationsfähigkeit weisen die verschiedenen Blutzellen eine zelllinienspezifische Genexpression auf. So exprimieren die unterschiedlichen Reifungsstufen und die sich entwickelnden Zelllinien charakteristische Zelloberflächenmarker, die sogenannten „cluster of differentiation“ (CD). Die hämatopoetische Stammzelle wird durch die Expression des Oberflächenmarkers CD34 gekennzeichnet ³. Die Hämatopoese findet ein Leben lang und in den verschiedenen Entwicklungsstufen in unterschiedlichen Organen statt. Nach der Geburt sind vor allem das Knochenmark, und in einem geringeren Umfang die Leber, die Hauptorte der HSC-abgeleiteten Hämatopoese ¹

Die Hämatopoese ist ein fein ausgewogener Prozess, welcher durch ein komplexes Netzwerk von extrinsischen und intrinsischen Reizen, Signalwegen, Wachs-

tumsfaktoren, Zytokinen, Transkriptionsfaktoren und anderen molekularen Komponenten streng kontrolliert wird⁴⁻⁵.

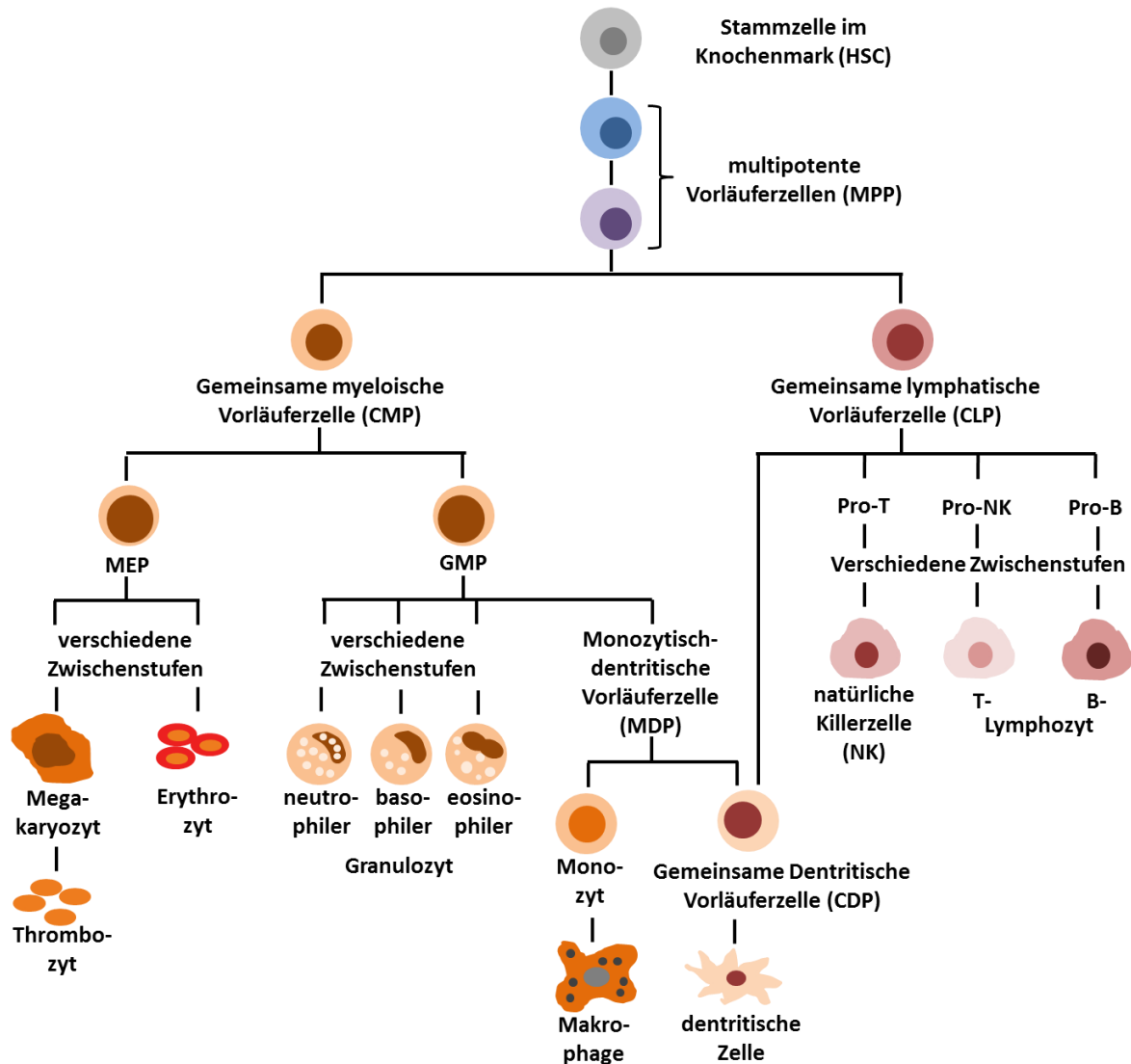


Abbildung 1: Entstehung der Blut- und Immunzellen im Knochenmark. Abbildung modifiziert nach¹⁻².

1.2 Leukämie

Der Fokus in der Krebsforschung liegt in der Identifizierung und Charakterisierung von Onkogenen und Tumorsuppressoren sowie die durch sie beeinflussten Abläufe wie Zellproliferation und Zelltod. Die Störung der normalen Zelldifferenzierung ist die Schlüsselkomponente in der Entstehung vieler Krebsarten ⁶. Der Begriff Leukämie steht für eine heterogene Gruppe hämatologischer Erkrankungen und bedeutet wörtlich "weißes Blut", wird aber auch als Blutkrebs bezeichnet. Die Erkrankung geht in der Regel von einer transformierten Zelle aus, deren ungehemmte Vermehrung zu einem Klon gleichartiger Zellen führt, deren Proliferation wiederum das normale blutbildende Gewebe verdrängt. Dieser Block der Differenzierung zeigt sich in der unkontrollierten Vermehrung hämatologischer Vorläuferzellen im Knochenmark und lymphatischen Geweben, wie Lymphknoten und Milz, sowie im Verlust ausgereifter funktionsfähiger Blut- und Immunzellen ⁴.

Je nachdem, welcher Zelltyp des hämatopoetischen Systems involviert ist, unterscheidet man in myeloische und lymphatische Leukämie. Darüber hinaus kann man die akute Leukämie, bei der viele der Blutvorläuferzellen im sogenannten „Blastenstadium“ verbleiben und ihre Fähigkeit zur Differenzierung verlieren, von der chronischen Leukämie abgrenzen, bei welcher die Vorläuferzellen hyperproliferativ sind, jedoch voll ausdifferenzieren können ⁷. Somit lassen sich anhand des Krankheitsverlaufs sowie der betroffenen Zelllinie die akuten und chronischen Leukämien grob in vier Hauptgruppen aufteilen:

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

Für eine Prognose und spätere Therapie gibt es eine genauere diagnostische Klassifizierung anhand verschiedener morphologischer wie auch zyto- und molekulargenetischer Veränderungen.

1.3 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine Erkrankung der Myelopoese mit maligner Transformation der hämatopoetischen Vorläuferzellen, die vor allem die Differenzierung myeloider und myelomonozytischer Zellen betrifft. Es kommt zu einer z.T. massiven Vermehrung von unreifen Vorläuferzellen im Knochenmark (KM) mit einer Verdrängung der normalen Hämatopoese und einer Ausschwemmung der Zellen in das periphere Blut (PB) (Leukozytose). In Folge dieser Verdrängung können Anämie (Blutarmut), vermehrte Infektionen aufgrund von Neutropenie sowie eine erhöhte Blutungsneigung durch Thrombopenie die Folge und zeitgleich auch erste Anzeichen einer akuten Leukämie sein. Die AML tritt mit einer Inzidenz von 3,7 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr und einer steigenden Häufigkeit im höheren Lebensalter auf. Sie betrifft Frauen und Männer gleichermaßen ^{4,8}.

Die systematische Einteilung der AML kann nach zwei verschiedenen Klassifikationen erfolgen. Die *French-American-British*-(FAB-)Klassifikation unterteilt die AML anhand morphologischer und zytochemischer Merkmale der Blasten ⁹ sowie Entitäten mit minimaler myeloischer Differenzierung ¹⁰⁻¹¹ in 8 Subtypen (M0 – M7) (Tabelle 1).

Tabelle 1: FAB-Klassifikation nach ¹²

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

Nach neuen Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation - WHO) sind zusätzlich molekularbiologische Merkmale für die Einteilung der verschiedenen Subtypen wichtig. Die Einteilung der AML durch die WHO ist somit nicht ganz konsistent mit der FAB-Klassifikation¹³. Die WHO unterteilt die AML anhand zytogenetischer, molekulargenetischer wie auch morphologischer Veränderungen in folgende vier Hauptgruppen:

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

Gemäß der WHO ist die Diagnose einer AML zu stellen, wenn der Anteil pathologischer Myeloblasten an den nukleären Zellen von Knochenmark und/oder Blut $\geq 20\%$ beträgt¹⁴. Die FAB-Klassifikation legt einen Blastenanteil von $\geq 30\%$ für die Diagnostik einer AML bei Erwachsenen fest⁹.

Eine prognostische Einteilung der AML ist aufgrund zytogenetischer Untersuchungen möglich. Eine günstige Prognose haben hierbei Patienten mit einer Translokation wie $t(8;21)$ und $t(15;17)$ oder der Inversion $inv(16)$ ¹⁵⁻¹⁶ sowie *CEBPA* Mutationen¹⁷⁻¹⁹, während ein hohes Alter (>60)²⁰, eine sekundäre AML, der Verlust von Chromosom 5 oder 7, die Translokationen $t(6;9)$ ^{16,21}, $t(9;22)$ sowie ein komplex veränderter Karyotyp²² mit einer schlechten Prognose verbunden sind. Die Akute Promyelozyten-Leukämie (APL) mit der Translokation $t(15;17)$ hat die beste Prognose. Die Heilungsrate liegt bei über 80% bei der Behandlung mit Vitamin-A-Säure (ATRA)²³.

1.4 CCAAT / enhancer-binding Proteine (C/EBPs)

Die CCAAT/enhancer-binding Proteine C/EBP α , C/EBP β , C/EBP γ , C/EBP δ , C/EBP ϵ und C/EBP ζ bilden eine Familie der Leuzin-Zipper Transkriptionsfaktoren²⁴⁻²⁹. Die C/EBP Isoformen zeichnen sich durch eine hohe Sequenzgleichheit im hochkonservierten C-terminalen Bereich mit einem Basisbereich zur DNA-Bindung und einer leuzinreichen Dimerisationsdomäne (bZIP; basic region and leucin zip-

per) sowie einer variablen N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD) aus. Die C/EBP Proteine können sowohl homo- als auch heterodimer an palindromen DNA-Bindungsstellen binden ^{27,30}.

Die Mitglieder der C/EBP-Familie spielen wichtige Rollen bei der Kontrolle zellulärer Differenzierung und Proliferation, Metabolismus, Inflammation sowie Krankheiten und verschiedenen Stoffwechselfvorgängen. In der Hämatopoese sind vor allem C/EBP α , C/EBP β , und C/EBP ϵ von besonderer Bedeutung. In der frühen Granulopoese, der Differenzierung zum Promyelozyten, spielt vor allem C/EBP α eine wesentliche Rolle ³¹ wohingegen C/EBP ϵ in der terminalen granulozytären Differenzierung entscheidend ist ³²⁻³³. C/EBP β ist während der myeloiden Differenzierung hochreguliert ³¹, und essentiell für die Zytokin-induzierte Granulopoese ³⁴.

1.4.1 CCAAT / enhancer-binding protein α

Das den Transkriptionsfaktor CCAAT / enhancer-binding protein α (C/EBP α) kodierende Gen liegt auf Chromosom 19q13.1 ³⁵. Es besteht aus einem einzigen 2783 Basenpaare großen, sehr GC-reichen (über 70%) Exon, welches ein 358 Aminosäuren umfassendes gleichnamiges Protein kodiert ³⁶. Messbare C/EBP α -Expressionslevels sind im Fettgewebe, Leber, Pankreas, Dünn- und Dickdarm, Lunge, Nebenniere, Skelettmuskel, Prostata sowie der Plazenta und in mononuklearen Zellen des peripheren Blutes zu finden ³⁶⁻³⁷. Keine oder sehr geringe Expressionen von C/EBP α wurden in Gehirn, Niere, Thymus, Hoden und Eierstöcken ³⁷ gemessen.

C/EBP α bindet an die spezifische DNA-Sequenz ‚CCAAT‘, welche in vielen Promotorbereichen von mRNA codierenden Genen zu finden ist. Bei der Translation der *CEBPA* mRNA werden durch ribosomales Ablesen von zwei verschiedenen Startcodons (AUG) zwei Proteine, C/EBP α -p42 (42 kDa) und C/EBP α -p30 (30 kDa), gebildet. C/EBP α -p30 fehlen N-terminal zwei von drei Transaktivierungselementen (TE) und somit eine Transaktivierungsdomäne (Abbildung 2). In Folge dessen differieren die beiden Isoformen in ihren Funktionen hinsichtlich Genregulation und Proliferationskontrolle. Während C/EBP α -p42 als Transkriptionsaktivator fungiert sowie Differenzierung und Zellzyklusarrest induziert, besitzt C/EBP α -p30

ein weniger effizientes Transkriptionsaktivierungspotential und unterstützt die Proliferation^{19,38-39}.

Der Wildtyp C/EBP α -p42 besitzt drei TEs (TE-I, TE-II und TE-III), welche die Aktivierung der Transkription unterstützen, sowie eine bZIP-Domäne⁴⁰, welche eine Basisregion (BR) zur DNA-Bindung und eine Leuzin-Zipper-Region (LZ) zur Homo- und Heterodimerisation enthält (Abbildung 2).

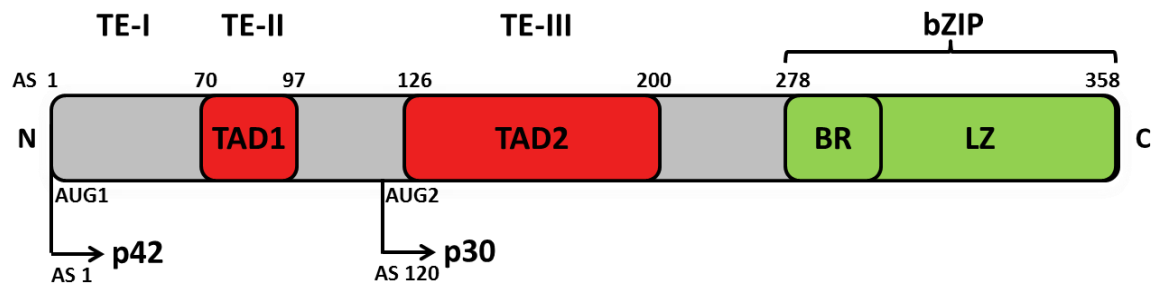


Abbildung 2: Aufbau und funktionelle Domänen des C/EBP α Proteins. N-Terminal befinden sich die TAD 1 und 2, welche ein hohes Transaktivierungspotential besitzen. Die TE I-III, unterstützen die Aktivierung der Transkription. Die C-terminal gelegene bZIP-Region des C/EBP α -Gens setzt sich aus einer spezifisch DNA-bindenden BR und einem für Homo- oder Heterodimerisation notwendigen LZ zusammen. Die Zahlen direkt über dem Schema bezeichnen die Aminosäuren (AS) des humanen C/EBP α . Unten sind die zwei verschiedenen Startcodons (AUG) aufgeführt, von denen die beiden Isoformen p42 und p30 gebildet werden. Abbildung modifiziert nach⁴¹.

In vitro vermitteln die Domänen TE-I und TE-II gemeinsam die Bindung von C/EBP α an das TATA-Box bindende Protein (TBP) und den Transkriptionsfaktor IIB, zwei essentielle Komponenten des basalen Transkriptionsapparates⁴². TE-III besitzt dagegen eine negativ regulierende Subdomäne⁴⁰.

1.4.2 C/EBP α in der Hämatopoese

Die Hauptaufgabe von C/EBP α im hämatopoetischen System liegt in der Regulation der granulozytären sowie monozytären Differenzierung, deshalb wird C/EBP α auch als Hauptregulator in der Granulopoese und Monopoese bezeichnet⁴³⁻⁴⁴. C/EBP α wird in HSCs, myeloiden Vorläuferzellen und Granulozyten, aber nicht in Makrophagen exprimiert⁴⁵. Es wird vor allem für die Differenzierung von CMPs zu GMPs benötigt. Nach dem GMP-Stadium wird C/EBP α dann nicht mehr für die

granulozytäre Differenzierung gebraucht⁴⁶. Die Expression von C/EBP α ist somit in den proliferierenden myeloiden Vorläuferzellen relativ hoch und nimmt während der Reifung der Zellen zu Granulozyten ab³¹. Allein eine konditionelle Überexpression von C/EBP α ist ausreichend, um die neutrophile Differenzierung bei bipotenten Zellen zu induzieren und gleichzeitig die Reifung monozytärer Zellen zu inhibieren⁴⁵. Das Proto-Onkogen RAS verstärkt die Aktivität von C/EBP α zur Induktion der granulozytären Differenzierung durch die Phosphorylierung des Serins 248 der Transaktivierungsdömane⁴⁷. In konditionellen C/EBP α -Knockout-(C/EBP $\alpha^{-/-}$)-Mäusen wiederum konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von C/EBP α zu einem frühen selektiven Block in der Granulozytendifferenzierung (Reifungsphase der CMPs zu GMPs) und dadurch zu einem bedingten Fehlen funktionsfähiger reifer Granulozyten führt, ohne eine Beeinflussung anderer hämatopoetischer Linien^{46,48}, was die Bedeutung von C/EBP α in der frühen Granulozytenbildung unterstreicht. Diese induzierbaren C/EBP $\alpha^{-/-}$ -Mäuse weisen eine Akkumulation von myeloiden Blasten in diesem Teilstadium auf⁴⁶, ähnlich dem Bild einer humanen AML.

Während der Granulopoese reguliert C/EBP α die Promotoren zahlreicher granulozytenspezifischer Gene wie z.B. G-CSF-Rezeptor⁴⁹, GM-CSF-Rezeptor⁵⁰, M-CSF-Rezeptor, CD14, Myeloperoxidase⁵¹, Lysozyme und Neutrophile Elastase⁵² sowie Lactoferrin^{45,53}. Des Weiteren ist C/EBP α ein entscheidender Faktor für die Aufrechterhaltung der Balance zwischen Zellproliferation und Differenzierung⁵⁴.

1.4.3 C/EBP α in der Leukämogenese

Der frühe Differenzierungsblock bei myeloiden Vorläuferzellen und die daraus resultierende Akkumulation von Blasten im Knochenmark sowie peripheren Blut sind Merkmale der AML. Bei der Entstehung einer AML sind am häufigsten Transkriptionsfaktoren dereguliert⁶. Ein Fehlen der C/EBP α -Expression bzw. der Verlust seiner Funktionsfähigkeit in leukämischen Blasten lässt auf eine wichtige Funktion von C/EBP α als Tumorsuppressor schließen⁵⁵⁻⁵⁶. In einer AML mit unterdrückter C/EBP α -Funktion ist der Übergang von CMPs zu GMPs geblockt, was maßgeblich zu einer Häufung von myeloiden Blasten in diesem Teilstadium führt⁴¹.

In fast 50% aller AMLs ist C/EBP α durch verschiedene Mechanismen fehlreguliert⁵⁶⁻⁵⁸ einschließlich der eigenen Mutationen^{56,59-61}. Eine supprimierte C/EBP α -Expression konnte in AML-Subtypen mit verschiedenen Translokationen nachgewiesen werden. Im Subtyp AML-M2 mit der Translokation t(8;21) inhibiert das Fusionsprotein AML1-ETO die Expression der *CEBPA* mRNA⁵⁷. Eine Deregulation der C/EBP α Proteinexpression wurde in AML Subtypen mit FLT3-ITD Mutationen⁶²⁻⁶³ sowie in der AML-M3 mit Translokation t(15;17) durch das Fusionsprotein PML-RAR α ⁶⁴ gefunden. In chronisch myeloischen Leukämien (CML) konnte eine verminderte C/EBP α -Expression durch das Onkogen BCR-ABL nachgewiesen werden⁶⁵. Mutationen im *CEBPA*-Gen selbst sind für ungefähr 10% aller AML Fälle beschrieben⁵⁹. Die Mutationen von *CEBPA* sind entweder Punktmutationen in der C-terminalen bZIP Region oder Rastermutationen, sogenannte „frameshift“ Mutationen, in der N-terminalen Domäne. Auf Grund eines alternativen Startcodons in der *CEBPA* mRNA kann es zur verkürzten Isoform C/EBP α -p30 kommen, welche nur eine der beiden Transaktivierungsdomänen hat und dadurch viele Zielgene nicht effektiv aktivieren kann. Diesem verkürzten Translationsprodukt wird eine dominant-negative Rolle gegenüber dem Wildtypprotein C/EBP α -p42 zugeordnet. Heterozygote Mutationen im ersten Startcodon des Wildtypproteins und die damit einhergehenden Bildung von C/EBP α -p30 können zur Entstehung einer Leukämie beitragen^{55-56,58}. Verschiedene Studien zeigen aber eine günstige prognostische Signifikanz von *CEBPA* Mutationen in der AML^{17-18,66}.

1.5 Notch1

Notch (Notch homolog 1, transcription-associated (Drosophila) = Tan1) wurde erstmals 1919 als eines der ersten Gene der Schwarzbäuchigen Taufliege (*Drosophila melanogaster*) beschrieben⁶⁷. Durch eine heterozygote Mutation von Notch zeigten diese Taufliegen Kerben (engl. notches) in den Flügelrändern. Der Notch-Signaltransduktionsweg ist ein hoch konservierter interzellulärer Kommunikationsweg und umfasst bei den Vertebraten 4 verschiedene Rezeptoren (Notch1-4), 2 Jagged-Liganden (Jag1-2 (homolog zu Serrate) und 3 Delta-like-Liganden (Dll1, 3, 4). In Vertebraten regulieren die Notch-Proteine und ihre Liganden verschiedene Prozesse der frühen Embryogenese⁶⁸⁻⁶⁹, neuronalen Entwicklung⁷⁰,

Muskel-⁷⁰⁻⁷¹, Pankreaszell-⁷² sowie Granulozyten-⁷³⁻⁷⁴ und Lymphozytendifferenzierung⁷⁵⁻⁷⁶. Notch kann durch Inhibierung von Differenzierung und Apoptose sowie durch Förderung der Proliferation zur Karzinogenese beitragen.

Notch1 kodiert einen hoch konservierten Transmembranrezeptor und Transkriptionsregulator, welcher vor allem eine kritische Rolle in der T-Zell-Entwicklung spielt⁷⁷. Die Induktion von Notch-Signalwegen inhibiert Apoptose⁷⁸⁻⁷⁹ und fördert Zellproliferation⁸⁰. Notch1 wird in Vorläuferzellen⁷³ des Knochenmarks sowie im periphereren Blut bei T- und B-Lymphozyten, Monozyten und Neutrophilen exprimiert⁸¹⁻⁸². Notch1 nimmt im hämatopoetischen System regulatorischen Einfluss auf die Entwicklungsrichtung einer Zelle innerhalb einer Vorläuferpopulation^{75,83}, erhöht die Selbsterneuerung der Stammzellen und inhibiert die Differenzierung von Vorläuferzellen⁸⁴. In der Regulation der Stammzellen begünstigt Notch1 Selbsterneuerung gegenüber Differenzierung und favorisiert auf früher Ebene die lymphoide gegenüber der myeloiden Linie⁸⁴. Verschiedene Studien zeigen, dass eine Aktivierung von *NOTCH1* entweder durch die Behandlung mit Notch-Liganden oder durch eine verstärkte Expression von konstitutiv aktiviertem Notch1 zu einer Inhibierung der Granulozytendifferenzierung und Erhaltung eines unreiferen Phänotyps in den myeloiden Zelllinien 32D und HL-60 sowie in primären mausspezifischen und humanen Vorläuferzellen führt^{73,85-87}.

In soliden Tumoren sowie im hämatopoetischen System kann Notch1 eine Rolle als Onkogen sowie Tumorsuppressor spielen⁸⁸. Insbesondere in der akuten lymphatischen Leukämie der T-Zellen (T-ALL) wurden bei mehr als 50% der Patienten aktivierte *NOTCH1* Mutationen beobachtet⁸⁹⁻⁹⁰. Auch in der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) wurden aktivierende *NOTCH1* Mutationen identifiziert⁹¹⁻⁹². In der AML oder anderen bösartigen Tumoren sind *NOTCH1* Mutationen selten^{88,93-94}. In verschiedenen AML-Zelllinien sowie primären AML-Zellen konnte Notch1 Protein nachgewiesen werden⁹⁵. Sliwa et al. konnten in einer weiteren Untersuchung von AML-Patientenproben eine Hyperexpression von Notch1 in 7% der Fälle nachweisen. Die restlichen Patienten zeigten nur eine geringe Notch1 Expression. Diese Hyperexpression von Notch1 korreliert signifikant mit der Subgruppe M0/1. Zudem zeigten diese Patienten ein schlechteres Gesamtüberleben⁹⁶. Bisher konnte außerdem gezeigt werden, dass die Entwicklung einer AML durch die Induzierung von übermäßiger Selbsterneuerung verbunden mit einem Block der

Zelldifferenzierung durch eine abweichende Jagged1-Notch1-Signalisierung begünstigt wird⁹⁷. Eine Analyse des gesamten Transkriptoms in Patienten mit chronisch myelomonozytischer Leukämie (CMML) konnte zeigen, dass Notch-Signalisierung die Monozyten- und Granulozytendifferenzierung in einer frühen Phase inhibiert. Dies wird teilweise durch die direkte Hemmung des PU.1- und *CEBPA*-Promotors durch Hes1, ein direktes Ziel von Notch, vermittelt⁹⁸. Eine Aktivierung von Notch1 führt zudem zu einer Hochregulation von Trib2, was wiederum zu einer Abnahme des Proteins C/EBP α -p42 führt und so AML in Mäusen induziert⁹⁹⁻¹⁰⁰. AML-Patienten mit einer gestörten C/EBP α -Funktion zeigen eine hohe Trib2-Expression¹⁰⁰⁻¹⁰¹. Die tumorsuppressive Wirkung von Notch1 wiederum konnte bei einer weiteren Untersuchung von humanen AML-Patientenproben sowie AML-initiiierenden Zellen eines Mausmodells gezeigt werden. Diese Zellen wiesen eine Unterdrückung von Notch1 auf. Eine Aktivierung von Notch1 führte zu einer raschen Hemmung des Zellzyklus, der Differenzierung und Apoptose der AML-initiiierenden Zellen. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung von Notch zum Verlust des myeloiden Tumorsuppressors Tet2 und somit zur Induktion einer AML-ähnlichen Krankheit führt¹⁰².

1.6 miRNA

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine (~22 Nucleotide), einzelsträngige, nicht-proteinkodierende RNAs, welche als genregulierende Faktoren wirken. Viele miRNAs weisen eine Konservierung unter den verschiedenen Spezies auf, was annehmen lässt, dass miRNAs in wesentliche regulative Prozesse eingebunden sind. Die erste miRNA wurde vor über 20 Jahren beschrieben¹⁰³. Seitdem haben die Anzahl bekannter miRNAs sowie ihre Bedeutung stetig zugenommen. Die letzte Version der miRBase Sequence Datenbank listete 2585 reife humane miRNAs und über 1920 reife murine miRNAs (miRBase Release 21 (Juli 2014), mirbase.org).

miRNAs kommen ubiquitär oder limitiert in bestimmten Entwicklungsstadien oder spezifischen Gewebearten bzw. Zelltypen vor¹⁰⁴. Sie beeinflussen zahlreiche biologische Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung, Apoptosis, Organbildung und viele mehr, indem sie translational spezifische Ziele inhibieren¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. Bei Neoplasien, einschließlich Leukämie, führen verschiedenste Auslöser zu einer Stö-

rung des genetisch geregelten Gleichgewichts zwischen Zellzyklus und Apoptose. Eine steigende Zahl von Arbeiten zeigt, dass die Deregulation von miRNAs mit der Entstehung von Neoplasien assoziiert ist ¹⁰⁹⁻¹¹⁰. Es wird vermutet, dass innerhalb des menschlichen Genoms 30 – 60% aller proteinkodierenden Gene direkt durch miRNAs reguliert werden können ¹¹¹⁻¹¹².

1.6.1 Biogenese und Funktionsweise

Die reifen miRNAs haben eine Länge von 19 – 25 Nukleotiden mit ein 5' Phosphat- und einer 3' Hydroxylgruppe. Die pre-miRNAs sind die unmittelbaren Vorläufer, welche eine charakteristische Stem-loop-Struktur mit 60-80 Basenpaaren Länge und einem 2 Nukleotid-Überhang am 3' Ende besitzen. Die pre-miRNAs wiederum werden von langen primären miRNA-Transkripten (pri-miRNAs), welche mehr als 1kb groß sein können und Produkte der RNA Polymerase II Aktivität sind, transkribiert ¹¹³. Die meisten pri-miRNAs sind unabhängige transkriptionelle Einheiten, obwohl bei Säugern viele miRNAs innerhalb eines Introns einer mRNA liegen und sich so scheinbar das gleiche primäre Transkript mit ihrem proteinkodierenden *host gene* teilen. Die Biogenese und Funktionsweise der miRNAs ist in Abbildung 3 dargestellt.

Die pri-miRNAs werden bei Säugern zuerst im Zellkern mittels Mikroprozessor-komplex Drosha/DGCR8, zu pre-miRNA Stem-loops mit 60 – 80 Basen verarbeitet ¹¹⁴⁻¹¹⁵. Die Pre-miRNA-Moleküle werden, in Assoziation mit dem Ran-GTP abhängigen Faktor Exportin-5 (Exp5), aktiv ins Zytoplasma transportiert ¹¹⁶⁻¹¹⁷, wo sie durch RNase III Dicer und TAR RNA-bindende Protein (TRBP) weiter in doppelsträngige (ds)RNA-Moleküle mit ca. 22 Nukleotiden Länge prozessiert werden ¹¹⁸. Diese dsRNA enthält die reife funktionelle miRNA (auch bekannt als miRNA-5p) und den komplementären Strang (bekannt als miRNA-3p oder miRNA*). Die miRNA-3p unterliegt normalerweise der Degradierung, obwohl sie auch als funktionelle miRNA agieren kann ¹¹².

Die reife funktionelle miRNA ist dann fähig die Expression von proteinkodierenden Ziel-mRNAs zu regulieren, indem sie an teilweise komplementäre Regionen bindet. Damit eine miRNA mit einer potentiellen Ziel-mRNA interagieren kann, muss eine gewisse Komplementarität einer kurzen Sequenz in der 3'UTR der Ziel-

mRNA zum miRNA-„seed“, einer 5' gelegenen und aus 2-8 Nukleotiden bestehenden Sequenz, welche die Funktion der miRNA vermittelt, bestehen¹²⁰.

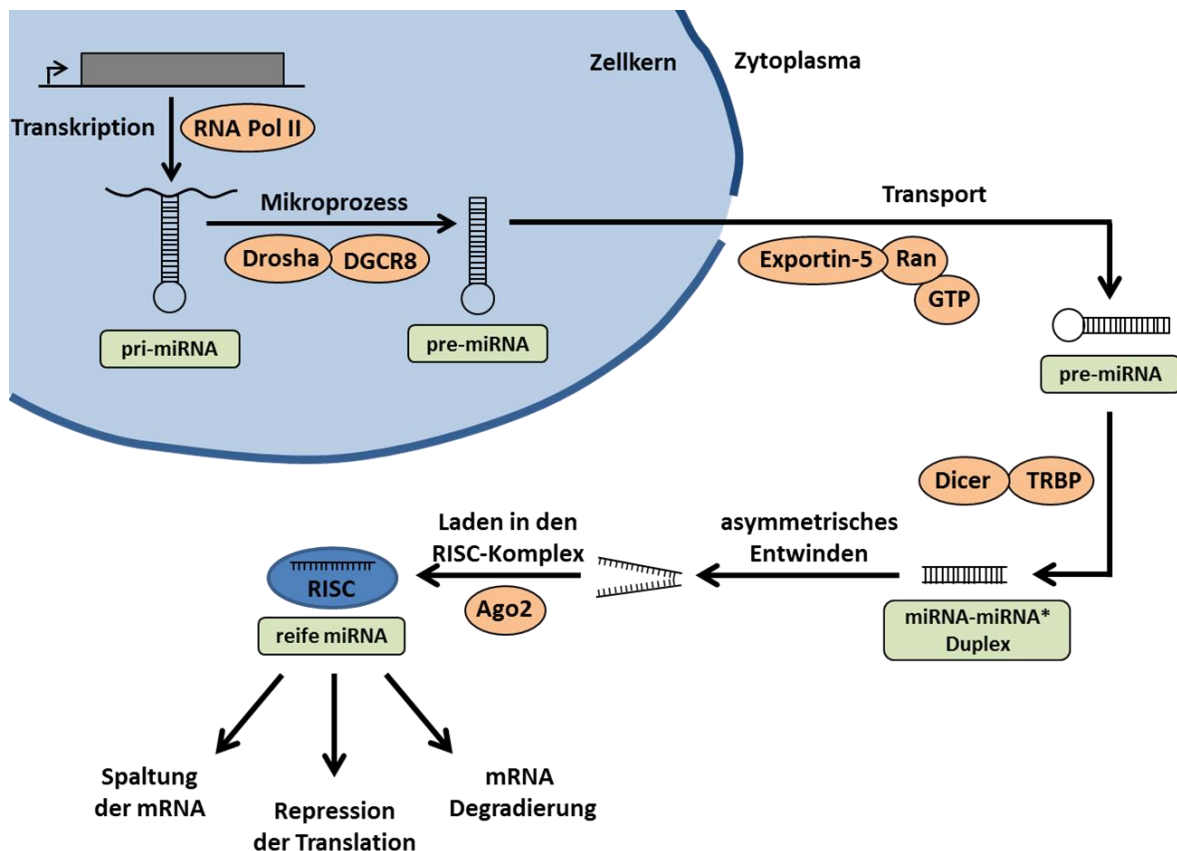


Abbildung 3: Die Biogenese und Funktionsweise der miRNAs. Im Zellkern wird die pre-miRNA durch die RNA Polymerase II und die Spaltung der pri-miRNA durch den Mikroprozessorkomplex Drosha–DGCR8 (Pasha) gebildet. Die gebildete pre-miRNA wird aus dem Zellkern mittels Exportin-5–Ran-GTP ins Zytoplasma transportiert, wo ein Komplex aus Dicer und TRBP die pre-miRNA in die reife miRNA spaltet. Der funktionelle Strang der reifen miRNA wird zusammen mit Argonaut-Proteinen (Ago2) in den RNA-induzierten Silencing Komplex (RISC) geladen, wo RISC die Ziel-mRNA durch mRNA-Spaltung, Repression der Translation oder Deadenylierung ausschaltet. Der zweite Strang wird degradiert. Abbildung modifiziert nach¹¹⁹.

Da die Komplementarität der Sequenzen von miRNAs und ihren mRNA-Zielen auf nur wenige Nukleotide beschränkt ist, kann jede miRNA mit vielen Genen interagieren. Im umgekehrten Fall, kann ein einzelnes Gen viele miRNA-Erkennungsstellen innerhalb einer oder mehrerer potentieller 3'UTRs beherbergen¹²¹. Die reife miRNA erkennt diese spezifischen Sequenzen der mRNA und rekrutiert dann eines der vier Argonaut-Proteine (Ago1-4) in einem RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC). RISC ist für die ortsspezifische Spaltung der mRNA,

die erhöhte Degradation der mRNA sowie der Repression ihrer Translation verantwortlich¹²²⁻¹²⁴.

1.6.2 miRNAs in der Hämatopoese

In der ersten Studie über miRNAs in der normalen Hämatopoese konnte schon gezeigt werden, dass die Expression einiger miRNAs spezifisch für bestimmte Linien im hämatopoetischen System ist. Eine solche Spezifität konnte für die miR-181, miR-223 und miR-142 gezeigt werden. Die miR-181 wird speziell in der lymphoiden Linie, die miR-223 vornehmlich im Knochenmark sowie myeloiden Zellen und die miR-142 in allen hämatopoetischen Geweben exprimiert¹²⁵. In CD34+ und den allgemeinen myeloiden Vorläuferzellen zeigt die miR-223 eine geringe Expression, welche in der granulozytären Entwicklung stetig steigt und in neutrophilen Granulozyten am höchsten ist¹²⁶⁻¹²⁷. In der monozytischen Linie ist die miR-223 Expression reprimiert¹²⁶. In die Regulation der Erythropoese ist die miR-223 ebenfalls involviert¹²⁸. Die miR-221, miR-222 und miR-24 inhibieren die normale Erythropoese¹²⁹⁻¹³⁰. Eine weitere miRNA, die eine Rolle in der Hämatopoese spielt, ist die miR-125b, welche in humanen Myeloblasten und Promyelozyten hoch exprimiert ist, aber in Neutrophilen herunterreguliert wird¹³¹. Die Expression der miR-125b führt zu einem Block der G-CSF-induzierten Differenzierung von Granulozyten¹³². In der lymphoiden B- und T-Zelldifferenzierung spielen neben der miR-181 auch die miR-150 und miR-155 eine Rolle. Die miR-150 ist vor allem in die B-Zelldifferenzierung, durch die Regulation von MYB, involviert¹³³. Für die Funktion der T- und B-Zellen ist die miR-155 von Bedeutung¹³⁴.

Bei der Analyse eines möglichen spezifischen miRNA-Expressionsmusters für die humane Hämatopoese, zeigten maligne Zelllinien gegenüber normalen humanen hämatopoetischen Zellen ein ähnliches Expressionsmuster, allerdings wurden deutliche Unterschiede im Expressionslevel der miRNAs gefunden. Diese Ergebnisse zeigen, wie wichtig miRNAs für die normale Hämatopoese sowie während der malignen Transformation sind¹³⁵.

1.6.3 miRNAs und C/EBP α in der Hämatopoese und AML

Diverse Arbeiten zeigen, dass C/EBP α spezifisch miRNAs regulieren kann. Fazi et al. identifizierten die miR-223 als erstes direktes Ziel von C/EBP α . Die C/EBP α -induzierte Hochregulation der miR-223 führt zur Granulopoese¹³⁶. Des Weiteren gibt es Studien die eine direkte Regulation der miR-223 sowie miR-34a durch C/EBP α in der normalen Granulopoese zeigen und deutlich machen, dass CEBPA als Tumorsuppressorgen durch die Transaktivierung dieser miRNAs agiert¹³⁷⁻¹³⁸. Außerdem konnte in diesen Studien gezeigt werden, dass in der AML, wo die Expression von C/EBP α fehlreguliert ist, die Transaktivierung dieser beiden miRNAs inhibiert und die myeloide Differenzierung geblockt ist¹³⁶⁻¹³⁸. Ein weiteres direktes Ziel von C/EBP α ist das miR-29a/b1-Cluster. Die miR-29b ist bei AML-Patienten mit fehlender C/EBP α -Funktion supprimiert¹³⁹.

Andere Arbeiten zeigen, dass miRNAs ebenso C/EBP α in der myeloiden Differenzierung regulieren. CEBPA ist ein direktes Zielgen der miR-328 sowie miR-124a. Eine Induktion von C/EBP α durch die miR-328 führt zu einer Stimulation der myeloiden Differenzierung¹⁴⁰. Im umgekehrten Fall supprimiert die miR-124a die myeloide Differenzierung durch Inhibierung von C/EBP α ¹⁴¹.

1.6.4 microRNA-30c (miR-30c)

Die reife microRNA-30c (miR-30c) gehört zur microRNA-30-Familie und wird von zwei verschiedenen Transkripten gebildet. Die reife miR-30c wird von zwei verschiedenen pri-miRNAs gebildet, welche unterschiedlich im Genom lokalisiert sind. Die pri-miR-30c-1 liegt auf Chromosom 1p34.2 im *host gene* NFYC (*nuclear transcription factor Y, gamma*) und bildet ein Cluster mit der, etwa 2800 Basenpaare *upstream* liegenden, miR-30e. Die pri-miR-30c-2 ist auf Chromosom 6q13 lokalisiert.

Die Mitglieder der microRNA-30-Familie sind z.B. beteiligt an der p53-induzierten mitochondrialen Teilung und Apoptose¹⁴², Regulation der B-Myb Expression während der zellulären Seneszenz¹⁴³, und spielen eine wichtige Rolle beim Zellwachstum und Differenzierung von Epithel-, Mesenchymal- und Osteoblastenzellen¹⁴⁴⁻¹⁴⁵. Bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass die miR-30c zu einer Redu-

zierung von Hyperlipidämie und Arteriosklerose führt¹⁴⁶. Einige Studien verschiedener Krebserkrankungen wie Blasen tumor¹⁴⁷, Mamakarzinom¹⁴⁸⁻¹⁴⁹ und Gebärmutterkörperkrebs¹⁵⁰ weisen eine negative Regulation der mir-30c in den Tumorzellen nach. Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass die miRNA-30c eine als Tumorsuppressor wirkende microRNA ist¹⁵⁰⁻¹⁵². Diese tumorsuppressive Wirkung konnte bereits bei Gebärmutterhalskrebs¹⁵⁰ sowie akuter myeloischer Leukämie mit *NPM1* Mutationen¹⁵² gezeigt werden.

Im hämatopoetischen System ist die miR-30c in verschiedenen Zelltypen wie Retikulozyten, Monozyten, Blutplättchen, Mononuklearen, B- und T-Lymphozyten sowie Granulozyten exprimiert¹⁵³.

1.7 Zielstellung

MiRNAs sind Regulatoren verschiedenster zellulärer Prozesse, wie z.B. Proliferation, Differenzierung und Apoptose, welche meist sehr stark bei Krebserkrankungen wie auch AML betroffen sind. Die Bedeutung von microRNAs in der Tumorgenese und insbesondere in der Entstehung der AML wurde bereits durch eine Vielzahl von Arbeiten postuliert und bestätigt. Die AML ist eine heterogene Erkrankung, die durch eine Vielzahl genetischer Defekte gekennzeichnet ist, welche vor allem in Bezug auf den Therapieansatz und die Prognose eine wichtige Rolle spielen. Die Störung und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie CEBPA sind neben genetischen Defekten zusätzliche Mechanismen, die an der Entwicklung einer AML beteiligt sind. Der Transkriptionsfaktor C/EBP α spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts von Zellproliferation und -differenzierung in hämatopoetischen sowie auch nicht hämatopoetischen Geweben. In diesem Zusammenhang wurde schon vielfach beschrieben das C/EBP α spezifisch miRNAs reguliert.

Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel mittels eines Mikroarray, neue direkt durch C/EBP α regulierte miRNAs in der Granulopoese zu identifizieren und eine funktionell zu untersuchen und zu charakterisieren. Da bei der Translation der CEBPA mRNA zwei Proteine, C/EBP α -p42 und C/EBP α -p30, gebildet werden, wurde untersucht welchen Einfluss diese Proteine auf die Expression der miR-30c während der Granulopoese haben. Des Weiteren wurde die Expression der miR-30c in ver-

schiedenen Zellpopulationen von C57BL/6-Mäusen sowie während der granulozytären Differenzierung von weiteren Zelllinien sowie primären hämatopoetischen Vorläuferzellen analysiert. Ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag besonders auf der Identifizierung eines neuen direkten funktionellen Ziels der miRNA. Hier wurde primär die Rolle der miR-30c in der Vermittlung inhibitorischer Funktionen von C/EBP α auf das Ziel untersucht. Weiterhin wurde geprüft, ob die miR-30c einen Einfluss auf die myeloide Differenzierung besitzt. Aufgrund der Fehlregulation von C/EBP α in der Hälfte aller AMLs, wurden in dieser Arbeit AML-Patientproben verschiedenster Subtypen hinsichtlich ihrer miR-30c Expression untersucht. Das Interesse lag hierbei auf NK-AML-Patientenproben mit *CEBPA*-Mutationen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Software

Geräte

Affymetrix 428™ GeneChip Scanners
 a-Hyb™ Hybridization Station
 Autoklav Model 5050 EVL
 Bakterieninkubator
 Brutschrank, Heracell 150i
 CCD-Kamera (G-Box)
 Durchflusszytometer BD FACSCalibur
 Elektrophoresesysteme
 Horizontal: Sub-Cell Model 192 Cell
 Vertikal: Mini Transblot®Cell
 Elektroporationsgerät Nucleofector® 2b Device
 Feinwaage AX4202
 Geldokumentation Gene Flash
 Kühlzentrifuge Heraeus Fresco 17
 Lichtmikroskop Axio Vert.A1
 Luminometer Lumat LB9705
 MACS® cell separation columns, MACS®
 separator
 Mikrowelle
 Milli-Q-Anlage
 Nano-Photometer
 pH-Meter
 Pipetten 2µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl
 Pipettierhilfe
 Power Pac 1000
 Real Time PCR System 7500
 Real Time Thermal Cycler (Rotor-Gene™ 3000)

Hersteller/ Vertrieb

Affimetrix
 Miltenyi, Biotec GmbH
 Tuttnauer
 Memmert GmbH
 Thermo Scientific
 Syngene Bioimaging
 BD Pharmingen™
 Bio-Rad Laboratories Inc.

 LONZA
 Sartorius
 Syngene Bioimaging
 Thermo Scientific
 Zeiss Deutschland
 Berthold Technologies
 MACS® reagents, Milteny
 Biotec
 Severin
 Millipore
 Implen
 Hanna Instruments
 Rainin; Eppendorf
 Integra Bioscience
 Bio-Rad Laboratories Inc.
 Applied Biosystems
 Corbett Research Australia

Schüttelinkubator Model 3031	GFL
Schüttler Rotamax 120	Heidolph
Sterilbank Modell HeraSafe Heraeus	Thermo Scientific
Stromversorgung Power Pac 1000	Bio-Rad Laboratories Inc.
Thermal Cycler T100™	Bio-Rad Laboratories Inc.
ThermoCycler (T Gradient Thermoblock)	Biometra®
Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories Inc.
Ultrazentrifuge Sorvall WX (TH-641 Rotor)	Beckman
Vortexer	Fisher Scientific
Wasserbad	GFL

Software

CellQuest™
 Cyflogic 1.2.1
 GenePix® Pro 6.0
 Image J
 SPSS17

Hersteller/ Vertrieb

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

2.1.2 Reagenzien

Chemikalien

Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30)
 Agar
 Ampicillin
 APS (Ammoniumperoxodisulfat)
 β-ME (β-Mercaptoethanol)
 Protein Assay Dye Reagent
 BSA (Bovine serum albumin) purified

 CaCl₂ (Calciumchlorid)
 DEPC (Diethylpyrocarbonat)
 dNTPs

Hersteller/ Vertrieb

Carl Roth GmbH
 Carl Roth GmbH
 Sigma-Aldrich
 Carl Roth GmbH
 Sigma-Aldrich
 Bio-Rad Laboratories Inc.
 SERVA Electrophoresis GmbH
 Carl Roth GmbH
 Carl Roth GmbH
 QIAGEN

DTT (Dithiothreitol)	Sigma Aldrich
ECL Westernblot Detektionsreagenzien	GE Healthcare Life science, Amersham Bioscience
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Carl Roth GmbH
Ethanol	Carl Roth GmbH
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Formaldehyd	Carl Roth GmbH
GelRed™ <i>Nucleic Acid Gel Stain</i>	Biotium Inc.
Giemsa	Carl Roth GmbH
Glycerin	Sigma-Aldrich
Glycerol	Sigma-Aldrich
HCl (Salzsäure)	Carl Roth GmbH
Hefe	Carl Roth GmbH
HEPES (Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure)	Carl Roth GmbH
Isopropanol	Carl Roth GmbH
May-Grünwald-Lösung	Sigma-Aldrich
Milchpulver	Carl Roth GmbH
Methanol	Carl Roth GmbH
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Carl Roth GmbH
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth GmbH
Na ₂ HPO ₄ (Natriumhydrogenphosphat)	Carl Roth GmbH
Phosphatase-, Proteinase Inhibitor Cocktails	Sigma-Aldrich
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Fluka
Ponceau S	Sigma-Aldrich
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH
Temed (Tetramethylethylendiamin)	Bio-Rad Laboratories GmbH
Tris-Base (Trisaminomethan)	Carl Roth GmbH
Tris-HCl	Carl Roth GmbH
Triton-X-100	Carl Roth GmbH
TRIzol®	Invitrogen
Tween®20	Carl Roth GmbH

Zytokine

huG-CSF (<i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>)	ImmunoTools GmbH
huGM-CSF (<i>Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor</i>)	ImmunoTools GmbH
IL-3 (Interleukin-3)	ImmunoTools GmbH
IL-6 (Interleukin-6)	ImmunoTools GmbH
rHuSCF (<i>Recombinant Human Stem Cell Factor</i>)	PAN™ Biotech GmbH
rHuFlt3 (<i>Recombinant Human Flt3-Ligand</i>)	PAN™ Biotech GmbH

Hersteller/ Vertrieb**Medien und Zusätze**

β-Estradiol	Sigma-Aldrich
CT-FBS (<i>Charcoal-treated fetal calf serum</i>)	PAA Laboratories GmbH
Chloroquin	Fluka
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	PAA Laboratories GmbH
FBS (Fötales Kälberserum)	PAA Laboratories GmbH
IMDM (<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>)	Gibco®
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Gibco®
PBS (<i>Phosphate buffered saline</i>)	PAA Laboratories GmbH
Polybren	Takara
Puromycin	MP Biomedicals
RA (Retinoic Acid)	Sigma-Aldrich
RPMI 1640 (± Phenolrot)	PAA Laboratories GmbH

Hersteller/ Vertrieb**Kommerzielle Kits**

AMAXA™ Cell line Nucleofector® Kit V	Lonza
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH
BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit	Invitrogen™
CD34 Progenitor Cell Isolation Kit, human	MACS® reagents, Milteny Biotec
ChIP-IT™ Express Enzymatic	Active Motif
Dual Luciferase™ Reporter Assay Kit	Promega GmbH
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	QIAGEN

Hersteller/ Vertrieb

HiSpeed® Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
Revert Aid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific
Lipofectamin™ LTX Reagent	Invitrogen™
miRCURY™ LNA microRNA Array microarray kit	EXIQON A/S
miRCURY™ LNA microRNA Array Labeling kit	EXIQON A/S
QuantiTect® SYBR Green PCR Kit	QIAGEN
QIAEX® II Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
TOPO® TA cloning Kit for subcloning	Invitrogen™

Enzyme

Antarctic Phosphatase
DNA Polymerase I
Phusion Polymerase
rAPid Alkaline Phosphatase
RNAse A
T4 DNA Ligase, 10X T4 DNA Ligase Buffer
Taq-Poymerase
XBal

Hersteller/ Vertrieb

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

Marker und Ladepuffer

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

Hersteller/ Vertrieb

Thermo Scientific
Thermo Scientific
Thermo Scientific

Vektoren

miRCURY LNA™ microRNA Inhibitor hsa-miR-30c, negative control A
pCDH1-MCS1-EF1-copGFP

Quelle

EXIQON A/S
System Biosciences

pcDNA3.1	Tenen DG, Harvard Institutes of Medicine, Massachusetts, ⁵⁶
pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR	Invitrogen™
pGL3-control Vektor	Promega GmbH
pMDLg/pRRE	Addgene
pRL0 (pRL-SV40 Renilla Luciferase reporter vector)	Promega GmbH
pRSV-Rev	Addgene
pCR-2.1®-TOPO®-Vector	Invitrogen™
VSVG	Addgene

Oligonukleotide

Für die Detektion der Expression der miRNAs miR-30c, miR-223, miR-15b, miR-21, miR-191, miR-23a, miR-142-3p, miR-106b, miR-20a, snoRNA135, snoRNA202 und RNUB6 wurden die spezifischen TaqMan® MicroRNA Assays verwendet. Die Primer zur Klonierung des Notch1 3'UTR Vektors wurden der Publikation¹⁵⁴ entnommen. Alle weiteren aufgelisteten Primer wurden manuell designt und von Biomers.net GmbH bezogen.

Semiquantitative PCR und quantitative Real-Time PCR

huC/EBPα FP	5'-TGG ACA AGA ACA GCA ACG AG-3'
huC/EBPα RP	5'-TTG TCA CTG GTC AGC TCC AG-3'
muC/EBPα FP	5'-GAC CAT TAG CCT TGT GTG TAC TGT ATG-3'
muC/EBPα RP	5'-TGG ATC GAT TGT GCT TCA AGT T-3'
C/EBPε FP	5'-CAG ACA GGA AGG CGC TGG G-3'
C/EBPε RP	5'-CGG CAG TGG CCA AAG GGG CCT T-3'
GCSF-R FP	5'-ACC TGG GCA CAG CTG GAG TGG-3'
GCSF-R RP	5'-CAG GCT GCT GTG AGC TGG GTC TGG-3'
Notch1 FP	5'-CAA CAT CCA GGA CAA CAT GG-3'
Notch1 RP	5'-GGA CTT GCC CAG GTC ATC TA-3'
GAPDH FP	5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'
GAPDH RP	5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'

Klonierung

mature miR-30c FP	5'-TGC TGT GTA AAC ATC CTA CAC TCT CAG CGT TTT GGC CAC TGA CTG ACG CTG AGA GTA GGA TGT TTA CA-3'
mature miR-30c RP	5'-CCT GTG TAA ACA TCC TAC TCT CAG CGT CAG TCA GTG GCC AAA ACG CTG AGA GTG TAG GAT GTT TAC AC-3'
Notch1 3'UTR FP	5'-GTA ACT TCT AGA CGA GAG GAG CCT TTT TAA AAC-3'
Notch1 3'UTR RP	5'-GTA CCA TCT AGA CAC CAT CAG TAT CAT TTT TAT TGC-3'
Notch1 3'UTR mut FP	5'-CAT GAC CAG ATG CGT CCC AAG ATG TTG ATT TTT ACT GTG TTT TAT AAA ATA CTG TCA AGT AAT CAG AAA AAG ACT TTA AAA GTG ATC TAC AT-3'
Notch1 3'UTR mut RP	5'-ATG TAG ATC ACT TTT AAA GTC TTT TTC TGA TTA CTT GAC AGT ATT TTA TAA AAC ACA GTA AAA ATC AAC ATC TTG GGA CGC ATC TGG TCA TG-3'

Sequenzierung

Luc-C FP	5'-AGA GAG ATC CTC ATA AAG GC-3'
EBV RP	5'-GTG GTT TGT CCA AAC TCA TC-3'

Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Primer #1 FP	5'-ACA TCT GTC TCT ACA ATC TCA ACA-3'
Primer #1 RP	5'-CAG GCA CTC TAT TTG ATG AAT GAA T-3'
Primer #2 FP	5'-CGA CCT TCA TCC CCC AGT TC-3'
Primer #2 RP	5'-CAC CCT GCC TAT CCT TGT GG-3'
Primer #3 FP	5'-CAA GCC CTG TAG TTG GGG AG-3'
Primer #3 RP	5'-AGC TTT AGT GGG GCA GAA GTC-3'
Primer #4 FP	5'-ACT CCA TTC ATG TGT ATG CCT CT-3'
Primer #4 RP	5'-ATG CAG CTT CTC ACT CTC TGG-3'

Antikörper

Western Blot Primärantikörper

Anti-Trib2 (SC-100878)	Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-GAPDH (SC-25778)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Notch1	Kaninchen, monoklonal	Epitomics

Hersteller/ Vertrieb

Western Blot Sekundärantikörper

ECL™ HRP-konjugiertes Anti-Kaninchen IgG	Affe, polyklonal	GE Healthcare Life Science
HRP-konjugiertes Anti-Maus IgG (SC-2005)	Gans, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology

Hersteller/ Vertrieb

Durchflusszytometrie Antikörper

PE-konjugierter anti-CD11b	Maus IgG _{1,k}	BD Pharmingen™
PE-konjugierter anti-CD34	Maus IgG _{1,k}	BD Pharmingen™
PE-konjugierte IgG-Isotyp	Maus IgG _{1,k}	BD Pharmingen™

Hersteller/ Vertrieb

ChIP Antikörper

Anti-C/EBPα X (SC-61)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
normales Kaninchen IgG (SC-2027)		Santa Cruz Biotechnology

Hersteller/ Vertrieb

2.1.3 Biologische Materialien

Bakterien

<i>Escherichia coli</i> XL-1blue	Agilent Technologies
One Shot® TOP 10	Invitrogen™
Subcloning Efficiency™ <i>DH5α</i> ™	Invitrogen™

Hersteller/ Vertrieb

C57BL/6 Maus

In C57BL/6 Mäusen wurde die Expression der miR-30c Expression analysiert. Die gesorteten Knochenmarksproben der Mäuse wurden vom Cancer Science Institute der Nationaluniversität von Singapur zur Verfügung gestellt. Das Studienprotokoll zur Forschung an C57BL/6 Mäusen wurde vom zuständigen Ethikkomitee geprüft. Die Knochenmarkszellen wurden mittels FACS ARIA nach LSK ($\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{cKit}^+$), CMP (allgemeine myeloide Vorläufer), GMP (Granulozyten-Makrophagen Vorläufer), MEP (Megakaryozyten-Erythrozyten Vorläufer) und Granulozyten sortiert. Es wurden 3 unabhängige Experimente mit einem Pool von je 3-4 Mäusen analysiert. Die RNA-Präparation sowie die Expressionsanalysen der miR-30c und snoRNA135 mittels quantitativer Real-Time-PCR wurden selbstständig am Universitätsklinikum Leipzig durchgeführt.

CEBPA knockout Maus

Erwachsene $\text{C/EBP}\alpha^{\text{flox/flox}}$; Mx-Cre konditional-gendefiziente Mäuse (B6.129S6(CBA)- $\text{Cebpa}^{\text{tm1Dgt/J}}$)⁴⁶ wurden mit *polyinosinic-polycytidylic acid* (Poly I:C) behandelt, um einen Mx-Cre Rekombinase vermittelten *knockout* von C/EBP α in hämatopoetischen Zellen zu induzieren. 600 μg Poly I:C wurde insgesamt fünf Mal intraperitoneal jeden zweiten Tag injiziert. Zwei Wochen nach der letzten Injektion wurden die Mäuse schmerzfrei getötet, da zu diesem Zeitpunkt eine mindestens 85%ige Entfernung des geflochten Gens in den Knochenmarkszellen vorliegt¹⁵⁵. Das Knochenmark wurde entnommen und mittels FACS ARIA der Block der myeloiden Differenzierung von den allgemeinen myeloischen Vorläuferzellen (CMP) zu den Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen (GMP) bestätigt. Diese Versuche wurden vollständig, von der Entnahme der Knochenmarkszellen bis zur Expressionsanalyse von CEBPA und der miR-30c per quantitativer Real-Time PCR, am Cancer Science Institute der Nationaluniversität von Singapur durch Dr. Vikas Madan durchgeführt.

primäre humane Zellen

Die primären humanen CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen wurden aus Leukapherisaten mittels Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation und Purifikation durch immunmagnetische Antikörper mittels CD34 Progenitor Cell Isolation Kit gewonnen. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Reinheit der isolierten Zellen überprüft. Die Reinheit lag durchschnittlich bei 93 % CD34+ Zellen.

Patientenproben

Von 39 verschiedenen AML-Patientenproben sowie drei gesunden Spendern wurde die Expression der miR-30c analysiert. Hierfür wurde die RNA aus Knochenmark oder peripherem Blut mittels TRIzol® extrahiert.

Die AML Patientenproben wurden, mit schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten entsprechend der Declaration of Helsinki, vom Universitätsklinikum Münster, vom Universitätsklinikum Leipzig und dem Münchner Leukämielabor (MLL) zur Verfügung gestellt. Die Proben der gesunden Spender sind vom Universitätsklinikum Leipzig. Die Studienprotokolle zur Sammlung von AML Patientenproben wurden durch die zuständigen Ethikkomitees geprüft. Die morphologische Diagnose wurde anhand der Kriterien der FAB-Klassifikation gestellt. Alle Proben wurden zytogenetisch und molekular analysiert. Es handelte sich um folgende AML Subtypen: zytogenetisch normaler (NK-AML) und komplexen Karyotyp (CK-AML), Translokation t(15;17), Translokation t(8;21), Inversion inv(16) sowie NK-AML Proben mit monoallelischen bzw. biallelischen *CEBPA*-Mutationen. Eine Auflistung der verwendeten Proben sowie alle Details sind in Tabelle 2 und

Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 2: Genetische und morphologische Charakterisierung von AML-Patienten

Patient	Morphologie nach FAB	Karyotyp	FLT3 Mutations	% Blasten	Alter	Geschlecht
	gesund	-	-	-	-	unbekannt
	gesund	-	-	-	-	unbekannt
	gesund	-	-	-	-	unbekannt
1	M4/5	NK	unbekannt	unbekannt	75	m
2	M1	NK	unbekannt	unbekannt	72	m
3	nicht klassifiziert	NK	negativ	unbekannt	21	m
4	nicht klassifiziert	NK	TKD	unbekannt	39	w
5	nicht klassifiziert	NK	negativ	unbekannt	43	w
6	nicht klassifiziert	NK	TKD	unbekannt	58	m
7	nicht klassifiziert	NK	ITD	unbekannt	70	w
8	M5	CK	negativ	90	65	w
9	M5	CK	unbekannt	unbekannt	73	m
10	M5	CK	unbekannt	90	56	m
11	nicht klassifiziert	CK	ITD/ TKD	unbekannt	29	m
12	nicht klassifiziert	CK	ITD	unbekannt	30	w
13	M3	t(15;17)	unbekannt	unbekannt	32	w
14	M3	t(15;17)	TKD	unbekannt	23	w
15	M3	t(15;17)	negativ	unbekannt	70	m
16	nicht klassifiziert	t(8;21)	ITD	unbekannt	42	m
17	nicht klassifiziert	t(8;21)	ITD/ TKD	unbekannt	67	m
18	M2	t(8;21)	unbekannt	unbekannt	40	m
19	M2	t(8;21)	unbekannt	23	43	w
20	nicht klassifiziert	t(8;21)	negativ	unbekannt	42	m
21	nicht klassifiziert	Inv(16)	negativ	unbekannt	60	m
22	nicht klassifiziert	Inv(16)	TKD	unbekannt	40	m
23	nicht klassifiziert	Inv(16)	TKD	unbekannt	39	m
24	nicht klassifiziert	Inv(16)	TKD	unbekannt	42	m
25	nicht klassifiziert	Inv(16)	TKD	unbekannt	29	m
26	nicht klassifiziert	Inv(16)	negativ	unbekannt	41	w
27	nicht klassifiziert	Inv(16)	negativ	unbekannt	45	w

Tabelle 3: Genetische und morphologische Charakterisierung von NK-AML Patienten mit *CEBPA*-Mutation und *CEBPA*-Wildtyp

Patient	Morphologie nach FAB	Karyotyp	<i>CEBPA</i> Mutation	% Blasten	<i>FLT3</i> Mutation	Alter	Geschlecht
1	s-AML	NK	WT	46	negativ	78	w
2	M4	NK	WT	unbekannt	negativ	74	m
3	M5a	NK	WT	99	negativ	82	m
4	M0	NK	WT	90	negativ	63	w
5	nicht klassifiziert	NK	mono-allelisch	unbekannt	negativ	65	m
6	nicht klassifiziert	NK	mono-allelisch	unbekannt	negativ	50	m
7	nicht klassifiziert	NK	mono-allelisch	unbekannt	negativ	73	w
8	nicht klassifiziert	NK	mono-allelisch	unbekannt	ITD	60	w
9	M2	NK	biallelisch	66	negativ	68	w
10	M2	NK	biallelisch	22	negativ	66	w
11	nicht klassifiziert	NK	biallelisch	unbekannt	negativ	66	w
12	M1	NK	biallelisch	58,5	negativ	82	m

Zelllinien**Quelle**

HEK 293T	humane, embryonale Nierenzellkarzinomzellen	ATCC
K562	humane chron. myeloische Leukämiezellen	ATCC
K562-C/EBP α -p42ER, K562-C/EBP α -p30ER,	K562 mit Expression eines Fusionsproteins C/EBP α -p42 bzw. p30 und Estradiolrezeptor	Tenen DG, Harvard Institut, MA, USA ¹⁵⁶
K562-ER	oder einzig des Estradiolrezeptors	
MV4;11	humane, akute monozytische Leukämiezellen	ATCC
U937	humane, histozytische Lymphomazellen	ATCC

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

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

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

Zusammensetzung der Kulturmedien

CD34+	IMDM + 10 % FBS, 50 ng/μl rHuSCF, 50 ng/μl rHuFlt3 und 50 ng/μl IL-6, welches nach 3 Tagen durch 50 ng/μl IL-3 ersetzt wurde
HEK 293T	DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S
K562	RPMI 1640 + 10% FBS + 1 % P/S
K562-C/EBPα-p42ER, K562-C/EBPα-p30ER, K562-ER	RPMI 1640 (ohne Phenolrot) + 10 % CT-FBS + 1 % P/S + 1 μg/ml Puromycin
MV4;11	IMDM + 10 % FBS + 1 % P/S
U937	RPMI 1640 + 10 % FBS + 1 % P/S

2.2.2 Differenzierung der Zellen

Die β-Estradiol-induzierbare Zelllinie K562-C/EBPα-p42ER exprimiert kein endogenes C/EBPα, hier liegt das C/EBPα-Wildtypprotein fusioniert mit dem Estradiolrezeptor im Zytoplasma der Zellen vor. Mittels β-Estradiol, welches an das Fusionsprotein C/EBPαp42-ER bindet, wird C/EBPα aktiviert, in den Nukleus translokalisiert und somit die Zelldifferenzierung induziert¹⁵⁶. Als Kontrollen dienten die Zelllinien K562-C/EBPα-p30ER, in denen das aktive C/EBPα-p42 aufgrund der

Mutation C/EBP α -p30 nicht aktiviert wird, sowie die, den Estradiolrezeptor allein tragende Zelllinie K562-ER. Die das Fusionsprotein enthaltenden Zellen, wurden durch kontinuierliche Kultivierung in Medium mit Puromycin selektiert. Bei der Induktion wurden jeweils 1×10^6 Zellen in 6-Lochplatten mit 2ml Medium mit 5 μ M β -Estradiol behandelt. β -Estradiol wurde in 100 % Ethanol gelöst. In den Zellen der Zelllinie U937 kann die myeloide Differenzierung durch die Zugabe von all-trans-Retinsäure (Tretinoin, engl.: all-trans-retinoic acid, kurz: ATRA) induziert werden. Hierfür wurden 1×10^6 Zellen in 2ml Medium in 6-Lochplatten ausplattiert und mit jeweils 1 μ M ATRA behandelt. ATRA wurde in DMSO gelöst. Zur granulozytären Differenzierung der primären humanen CD34+-Vorläuferzellen wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 6-Lochplatten mit 2ml Medium mittels 100 ng/ μ l G-CSF induziert¹⁵⁷. Während eines Experiments wurden die Zellen alle drei Tage mit G-CSF behandelt. G-CSF wurde in Wasser gelöst. Zum Ausschluss unspezifischer Effekte durch die Lösungsmittel Ethanol, DMSO und Wasser, wurde jeweils in die Kontrollen das entsprechende Volumen des Lösungsmittels zu den Zellen gegeben.

2.2.3 Gesamt-RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion besteht aus fünf Schritten - Homogenisierung, Phasentrennung, RNA-Präzipitation, Waschen und Lösen der RNA. Zum Homogenisieren wurden die Proben mit 1ml TRIzol® versetzt. Diese Lösung enthält Phenol und Guanidiniumthiocyanat in einphasiger Lösung. Anschließend wurden 200 μ l Chloroform dazugegeben, die Proben 15 s lang kräftig geschüttelt und für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Eine anschließende Zentrifugation von 15 min bei 13000rpm in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C führte zur Trennung der Proben in drei Phasen: eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine milchige Interphase und eine obere farblose wässrige Phase. Die RNA reichert sich ausschließlich in der oberen wässrigen Phase an, während DNA und Proteine sich in der Interphase und der Phenol-Chloroform-Phase befinden. Die obere Phase mit RNA wurde daraufhin in ein neues Gefäß überführt. Zur Präzipitation der RNA wurden 700 μ l Isopropanol zugegeben und das Gemisch 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Eine anschließende Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm in der Kühlzentrifuge bei 4 °C, führt dann zur Fällung der gelartigen RNA. Der Überstand

wurde verworfen. Zum Waschen der RNA wurde 1 ml 70 % igem Ethanol zu gegeben und dann 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde anschließend getrocknet und in 20 µl DEPC-Wasser gelöst. DEPC dient der Inhibierung von Ribonukleasen (RNasen), RNA zersetzenden Enzymen. Die extrahierte RNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Konzentrationsbestimmung der RNA

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

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* – PCR) ermöglicht enzymatisch von bestimmten Nukleotidsequenzen *in vitro* eine hochspezifische Vervielfältigung, selbst geringster Mengen DNA. Die PCR ermöglicht die Amplifikation eines DNA-Fragments (*Template*) über einen Bereich, der von zwei, dem *Template* komplementären synthetischen DNA-Oligonukleotiden (Primer) flankiert wird.

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

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

2.2.5.1 Reverse Transkriptase

Mittels retroviraler reverser Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, kann mRNA (*messenger RNA*) in cDNA (*complementary DNA*) überführt werden. Dies ermöglicht die PCR-Technik auch für die RNA-Analytik zu verwenden.

Für die Reverse Transkriptase Reaktion wurde das Revert Aid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit verwendet. Für die RT-Reaktion wurde je Probe 100 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Der RNA wurden jeweils 1 µl Oligo-(dT)-Primer, 4 µl 5fach Reaktionspuffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 2 µl dNTP Mix (10 mM), 0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor und 1 µl Reverse-Transkriptase (200 Units, Revert Aid™ H Minus M-Mul V Reverse Transcriptase) sowie DEPC-Wasser zu einem Gesamtvolumen von 20 µl zugegeben. Die Umschreibung der mRNA in cDNA erfolgte bei 42 °C für 60 min. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70 °C für 15 min abgestoppt. Das entstandene cDNA-Gemisch wurde direkt für die PCR verwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.2.5.2 Semiquantitative PCR

Für eine Standardreaktion wurde ein 20 µl Ansatz bestehend aus 2 µl cDNA, jeweils 1 µl des entsprechenden Primerpaares (10 pmol), je 2 µl dNTP-Mix (10 µM), 2 µl Reaktionspuffer, 2 µl MgCl₂ und 0,3 µl *Taq*-DNA-Polymerase (2,5 Units) und 9,7 µl DEPC-Wasser eingesetzt. Die PCRs wurde in einem ThermoCycler T Gradient Thermoblock bzw. Thermal Cycler T100 durchgeführt. Die Denaturierung erfolgte für 30 s bei 95 °C. Für die Amplifikation von GAPDH, CEBPA und NOTCH1 wurden 32 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 60 °C und bei G-CSF-R und CEBPE wurden 40 Zyklen und eine Annealing-Temperatur von 66 °C angewandt. Alle verwendeten Primer sind unter 2.1.2 (Oligonukleotide – Semiquantitative PCR und quantitative Real-Time PCR) aufgelistet.

2.2.5.3 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real time-PCR ermöglicht die zeitgleiche Amplifikation von Sequenzen und ihre quantitative Analyse. Das PCR-Produkt steigt während der Zyklen logarithmisch an, wie auch bei der qualitativen PCR, jedoch erlaubt die Real-Time-Methode eine genaue Quantifizierung der Ausgangsnukleinsäuren. Für die Reaktionen wurde das QuantiTect® SYBR Green PCR Kit verwendet. SYBR Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich in die kleine Furche doppelsträngiger DNA einlagert. Mittels Messung der emittierten Fluoreszenz (proportional zur DNA-Menge) in der exponentiellen Phase kann der Anstieg des PCR-Produktes in Echtzeit erfasst werden. Am Ende der PCR lässt sich aus den gewonnenen Daten die exponentielle Phase bestimmen, in deren Beginn eine Schwelle (*threshold*) gelegt wird, um jeder PCR-Messkurve eindeutig einem PCR-Zyklus-Wert zuzuordnen zu können, bei der das Fluoreszenz-Signal diesen Schwellenwert durchbricht (C_T -Wert, *threshold cycle*). Auf den letzten PCR-Zyklus folgt eine Schmelzkurvenanalyse, anhand derer man das PCR-Produkt mittels seiner spezifischen Schmelztemperatur, die sich aus der Zusammensetzung der Nukleotide ergibt, erkennt.

Die Reaktionen erfolgten in einem Rotor-Gene™ 3000, Real Time Thermal Cycler sowie im Real Time PCR System 7500. Zur Normalisierung wurde zudem die Expression von Referenzgenen (*housekeeping*-Gene) gemessen, da diese nicht reguliert und konstant exprimiert werden. Als Referenzgen wurde bei der Analyse der miRNAs RNUB6 in den Zelllinien und AML-Patientenproben sowie snoRNA135 und snoRNA202 bei den Mausexperimenten verwendet. Bei der Messung der mRNA wurde das *housekeeping*-Gen GAPDH gemessen. Die Analysen der miRNA Expression wurde unter Verwendung der entsprechenden TaqMan® MicroRNA Assays nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Alle verwendeten Primer sind unter 2.1.2 (Oligonukleotide – Semiquantitative PCR und quantitative Real-Time PCR) aufgelistet.

Die Berechnung erfolgte nach der Delta-Delta- C_T ($\Delta\Delta C_T$)-Methode der relativen Quantifizierung, um das Verhältnis der Gruppen zueinander zu ermitteln. Dabei wird die Expression des Zielgens auf die Expression des konstitutiv exprimierten Referenzgens bezogen und aus den Delta- C_T -Werten (ΔC_T) beider Gruppen anschließend der Delta-Delta- C_T -Wert ($\Delta\Delta C_T$) gebildet. Um den Expressionsunter-

schied (*fold change*) zwischen den beiden Gruppen zu ermitteln wird dieser Wert anschließend in die Formel $2^{-\Delta(\Delta C_T)}$ eingesetzt¹⁵⁸.

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

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

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

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse und präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten wurden Agarosegele verwendet. Nach einer semiquantitativen PCR wurden die Reaktionsprodukte in einem 1,5 %igem Agarosegel elektrophoretisch nach Größe aufgetrennt, da die Laufstrecke umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge ist. Durch das Anfärben des Agarosegels mit interkalierendem Ethidiumbromid bzw. GelRed sowie die Verwendung eines DNA-Größenstandards wurden die DNA-Banden in einem Geldokumentationsgerät visualisiert und analysiert.

2.2.7 microRNA-Array

Microarrays (DNA-Chip-Technologie) erlauben die Untersuchung differentieller Genexpressionsmuster in unterschiedlichsten Zellpopulationen. Die *microRNA-Arrays* müssen sich, im Gegensatz zum *DNA-Microarrays* für mRNA, nach der kurzen Natur (nt ~22) der miRNAs richten und zwischen miRNAs unterscheiden können, die sich nur durch ein einzelnes Nukleotid unterscheiden¹⁵⁹. Die Technologie der *MicroRNA-Arrays* basiert auf dem Gebrauch von *Locked Nucleic Acid* (LNA)-modifizierten Oligonukleotiden, die vorher durch Northern Blots und miRNA-spezifische *In-situ*-Hybridisierung-Assays identifiziert wurden¹⁶⁰⁻¹⁶². LNA ist ein synthetisches RNA/DNA-Analogon, das sich nach Einbau in die Oligonukleotide durch erhöhte Thermostabilität der Nukleinsäureduplexe auszeichnet¹⁶³.

Die Erstellung des miRNA-Expressions-Profiles nach lentiviraler Überexpression von C/EBP α in K562 Zellen wurde mittels miRCURY™ LNA microRNA Array microarray kit entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Auf dem *microRNA-Array* sind 454 miRNAs, die in miRBase Release 8.1 (July 2006) registriert waren, sowie Kontroll- und Mismatchproben, welche perfekt auf alle miRNAs in allen Organismen passen, angeordnet (*engl. array* = Anordnung). Nach Isolation

der gesamten RNA aus den transduzierten Zellen, wurde die RNA mit den Fluoreszenzfarbstoffen Hy3TM und Hy5TM mittels miRCURYTM LNA microRNA Array Labeling kit nach Protokoll des Herstellers gelabelt. Anschließend wurden die gelabelten RNAs gemeinsam auf den Chip (Glasplatte) gegeben und die miRNAs in der a-HybTM Hybridisation Station an ihren komplementären Gegenpart auf dem Array hybridisiert. Die gebundenen miRNAs wurden über die Bindung an die Fluoreszenzfarbstoffe Hy3TM und Hy5TM (entsprechend den Farbstoffen Cy3TM und Cy5TM) mittels eines Affymetrix 428TM GeneChip Scanners detektiert. Die so erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Computerprogramms GenePix[®] Pro 6.0 sowie Excel ausgewertet.

2.2.8 Klonierung

Das Einbringen eines gewünschten DNA-Fragments in einen Vektor, dessen Expression so die massenhafte Vermehrung dieser DNA ermöglicht, bezeichnet man als Klonierung.

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

Für den Luziferase Vektor mit der *NOTCH1* 3'UTR wurde die UTR Sequenz (1550 bp) aus genomischer DNA der Zelllinie U937 amplifiziert und in die XbaI Restriktionsstelle 3' zum Luziferasegen des pGL3-control kloniert.

Für den Überexpressionsvektor der miR-30c wurde die Sequenz der reifen miR-30c in den pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR Plasmid mittels des BLOCK-iTTM Pol II miR RNAi Expression Vector Kits nach Angaben des Herstellers kloniert. Alle verwendeten Primer sind in unter 2.1.2 (Oligonukleotide – Klonierung) aufgelistet.

2.2.9 *In-vitro*-Mutagenese

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

Die Mutation des *NOTCH1* 3'UTR WT Vektors (pGL3-NOTCH1-3'UTR-WT) erfolgte unter Verwendung des QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis kit entsprechend den Herstellerangaben. Der *NOTCH1* 3'UTR WT Vektor wurde mit spezifischen Primern (siehe 2.1.2 Oligonukleotide – Klonierung), in deren Sequenz verschiedene Basen, entsprechend der gewünschten Mutation in der spezifischen Bindesequenz der miR-30c, gegen andere ausgetauscht wurden, mutiert. Hierfür wurden 7 Punktmutationen (1513 G→C, 1514 A→U, 1517 G→C, 1518 U→A, 1522 U→A, 1523 U→A, 1524 A→U) basierend auf der PCR-Technologie eingebaut. Durch Sequenzierung des mutierten Vektors (pGL3-NOTCH1-3'UTR-mut) wurde die erfolgreiche Mutation kontrolliert (Primer siehe 2.1.2 (Oligonukleotide – Sequenzierung)).

2.2.10 Gewinnung von Plasmiden

Plasmide sind kleine extrachromosomale ringförmige, autonom replizierende, doppelsträngige DNA-Moleküle. Zur Gewinnung von Plasmiden wurden DH5 α (Stamm der *Escherichia coli*) entsprechend des Herstellerprotokolls transformiert. Die Plasmide besitzen ein Ampicillinasegen, das ein selektives Wachstum der, das Plasmid enthaltenden und exprimierenden Kolonien ermöglicht. Die Bakterien suspension wurde auf Petrischalen mit Ampicillin versetztem LB-Agar aufgetragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit einer Impföse eine Kolonie entnommen und in 200 ml Ampicillin versetztem LB-Flüssigmedium für 12-16 h bei 37 °C und konstantem Schütteln (200 rpm) inkubiert. Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurde das HiSpeed® Plasmid Maxi Kit bzw. EndoFree® Plasmid Maxi Kit folgend den Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.11 Transiente Transfektion

Das zeitweilige Einbringen von DNA in eine eukaryote Zelle mit dem Ziel der vorübergehenden Expression eines Gens, bezeichnet man als Transfektion. Es wurden verschiedene Transfektionsmethoden wie Lipofektion, Elektroporation und Calcium-Phosphat-Transfektion verwendet. Diese Methoden zeigen eine sehr hohe Effektivität bei der Transfektion von Suspensionszellen.

2.2.11.1 Lipofektion mit Lipofectamin™ LTX

Bei der Lipofektion wird die DNA mit Hilfe von Liposomen eingeschleust. Die Liposomen fusionieren mit der Zellmembran und ermöglichen so den Transport der DNA ins Zellinnere.

Für das Luziferase Reporter Assay wurden MV4;11 Zellen in einer Dichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ 500 μ l je Ansatz in 24-Lochplatten ausplattiert. Je Ansatz wurden immer 0,7 μ g des jeweiligen Luziferasekonstruktes (pGL3-NOTCH1-3'UTR-WT bzw. mut), 0,1 μ g der internen Kontrolle (pGL0) und 1,4 μ g des microRNA-Überexpressions-vektors (pCDNA6.2-emGFP-miR-30c) bzw. des Kontrollplasmids (pCDNA6.2-emGFP-miR) mittels Lipofectamine™ LTX nach Herstellerangaben transfiziert.

2.2.11.2 Elektroporation mit AMAXA™ Nucleofector Cell line Kit V

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

Für die Transfektion des CEBPA-Expressionskonstruktes (C/EBP α -pCDNA3) sowie der LNA Oligonukleotide wurden je Ansatz $1 \cdot 10^6$ Zellen im AMAXA™ Elektroporationsgerät mittels eines zelllinienspezifischen Programms mit optimierten elektrischen Parametern (T-16 für K562 sowie K562-C/EBP α -p42ER Zellen) und dem AMAXA™ Nucleofector Cell line Kit V nach Angaben des Herstellers behandelt.

2.2.11.3 Calcium-Phosphat-Transfektion

Bei der Calcium-Phosphat-Transfektion wird die DNA mittels DNA-Calcium-Phosphat-Kopräzipitaten, die auf der Zelloberfläche adsorbieren, durch Phagozytose in die Zellen aufgenommen¹⁶⁴.

Diese Methode wurde zur Gewinnung des Lentivirus angewendet. Hierfür wurden der Expressionsvektor C/EBP α -pCDH1-MCS1-EF1-copGFP bzw. der Leervektor zusammen mit den Verpackungsplasmiden pVSVG, pRSV-Rev und pMDLg/pRRE in einer CaCl₂-Lösung vorgelegt und unter ständigem Mischen mit Phosphatpuffer (2xHBS, pH 6,95 – 7,1) versetzt. Die gebildeten Calcium-Phosphat-Kopräzipitate wurden tropfenweise in das Kulturmedium zu den Zellen der Verpackungszelllinie HEK293T gegeben. Zur Steigerung der Transfektionseffizienz wurde dem Medium Chloroquin zugegeben.

2.2.12 Gewinnung des Lentivirus

Der Überstand der mit Calcium-Phosphat transfizierten HEK293T Zellen enthält das Lentivirus, dieses wurde 24 und 48 h nach der Transfektion gesammelt, gefiltert (0,45 μ m Filter) und bei 35.000 rpm (~ 150.000 g) sowie 4 °C für 2 h in einer Sorvall WX Ultrazentrifuge (TH-641 Rotor) zentrifugiert und anschließend das Pellet in 50 μ l des Mediums resuspendiert. Der Virustiter wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Das Virus hatte einen Titer von durchschnittlich $2,2 \cdot 10^6$ VP/ μ l. Das Virus wurde entweder direkt auf die zu transduzierenden Zellen gegeben oder bei -80 °C gelagert.

2.2.13 Transduktion der Zellen mit dem Lentivirus

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

Für die lentivirale Transduktion wurden $1 \cdot 10^6$ K562 Zellen je Ansatz in 6-Lochplatten ausplattiert und an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit dem Lentivi-

rus behandelt. Dem Kulturmedium wurde Polybren zugegeben, um die Infektionseffizienz zu erhöhen. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Fluoreszenz des GFP-Markers ermittelt und die Transduktionseffizienz des Lentivirus bestimmt. Diese lag im Durchschnitt für C/EBP α -pCDH-MS1-EF1-cop-GFP bei 70 % und für pCDH-MS1-EF1-cop-GFP bei 83 %.

2.2.14 Luziferase-Reporter-Assay

Mittels Reporter-genkonstrukten kann man spezifisch eukaryotische Genexpression untersuchen und quantitativ analysieren. Als Reportergene verwendet man vornehmlich Expressionskonstrukte, die Proteine kodieren, welche einfach und mit hoher Sensitivität nachweisbar sind. Beim Luziferase Reporter Assay nutzt man das hochsensitiv nachweisbare Enzym Luziferase. Mittels eines Luminometers werden die Photonen, die durch katalytische Oxidation des Luziferins entstehen, gemessen. Beim Dual-Luciferase™ Reporter-Assay-System werden innerhalb eines Systems zwei verschiedene Luziferasen simultan exprimiert und gemessen: zum einen, die Firefly (*Photinus pyralis*)-Luziferase, die als Reporter im verwendeten Luziferase-Reporterkonstrukt vorhanden ist, und zum anderen die Renilla (*Renilla reniformis*)-Luziferase, die unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors steht und so bei Ko-Transfektion als Kontrollreporter (pRL0) dient. Die Aktivität des Luziferase-Reporterkonstrukts korreliert mit dem Effekt der untersuchten Faktoren auf die spezifische Genexpression, während die des ko-transfektierten Kontrollreporters eine interne Kontrolle darstellt, durch welche die erhobenen Werte normalisiert werden, um experimentelle Variabilität wie z.B. die Lebensfähigkeit der Zellen oder Transfektionseffizienz zu verringern. Das Dual-Luciferase™ Reporter-Assay wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.15 Durchflusszytometrie (FACS)

Zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen, Peptiden und DNA wird das Verfahren der Durchflusszytometrie angewendet. Das grundlegende Prinzip ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten spezifischen Antikörpern durchgeführt wird. Die Anti-

körper sind meist gegen bestimmte Oberflächenproteine (z.B. Proteine der CD-Klassifizierung) gerichtet.

Um die Expression spezifischer Oberflächenantigene wie CD34 und CD11b während der Zelldifferenzierung zu bestimmen, wurden die Zellen mit den entsprechenden PE-markierten Antikörpern inkubiert und im Durchflusszytometer gemessen. Zur Bestimmung der Transduktionseffizienz des Lentivirus wurden die Zellpopulationen mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie analysiert, um den Prozentsatz GFP-exprimierender Zellen zu quantifizieren. Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit der CellQuest-Software bzw. Cyflogic.

2.2.16 Proteinbestimmung

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

2.2.17 Elektrophoretische Auftrennung der Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE)

Proteine lassen sich entsprechend ihrer jeweiligen Molmasse in einer diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese auftrennen. In einem vertikalen Gelelektrophoresesystem passieren die Proben zunächst ein Sammelgel zur Vortrennung sowie Aufkonzentrierung und anschließend ein Trenngel, wo sich die Proteine aufgrund ihrer molekularen Größe trennen. Die Polymerisation der SDS-Polyacrylamidgele erfolgte durch Zugabe von APS und TEMED. 30-90 µg Proteinlösung, welche die zu trennenden Proteine enthielt, wurde mit Ladepuffer gemischt und anschließend sofort für 10 min bei 95 °C hitzedenaturiert. Die Proteine sowie eine farbstoffmarkierte Standardproteinmischung, Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder als Laufkontrolle und zur Molekulargewichtsabschätzung, wurden auf das Gel geladen und durch Anlegung einer Spannung von 200 V für 1 h aufgetrennt.

2.2.18 Western-Blot

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

2.2.19 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Chromatin-Immunopräzipitation ist eine Methode zur Analyse von Protein-DNA-Interaktionen im Chromatinkontext lebender Zellen. Die zu einem bestimmten Zeitpunkt bestehenden Protein-DNA-Komplexe in den Zellen wurden durch eine Kondensationsreaktion mittels Formaldehyde fixiert, und so reversible quervernetzt. Nachdem die Zellen lysiert und das Chromatin fragmentiert wurde, erfolgte die Immunopräzipitation (IP) mit einem spezifischen gegen das DNA bindende Protein gerichteten Antikörper. Nach der IP ist die Vernetzung aufgehoben, die Proteine werden mit Hilfe von Proteinase K entfernt und die DNA ist wiederhergestellt. Die DNA wird dann mittels spezifischer Primer in einer PCR analysiert, um zu bestimmen welche DNA-Fragmente einen Komplex mit dem entsprechenden Protein gebildet haben.

Um die Bindung von C/EBP α im Promotorbereich der MIR30C-Gene zu untersuchen, wurden mit β -Estradiol stimulierte K562-C/EBP α -p42ER Zellen nach 4 h analysiert. Das Chromatin-Immunopräzipitation-Assay wurde mittels CHIP-IT™ Express Enzymatic entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die spezifischen Primer wurden entsprechend den vier potentiellen C/EBP α -Bindestellen im Promotorbereich der pri-miR-30c-1 und pri-miR-30c-2 designt. Alle verwendeten Primer sind unter 2.1.2 (Oligonukleotide - Chromatin-Immunopräzipitation) aufgelistet.

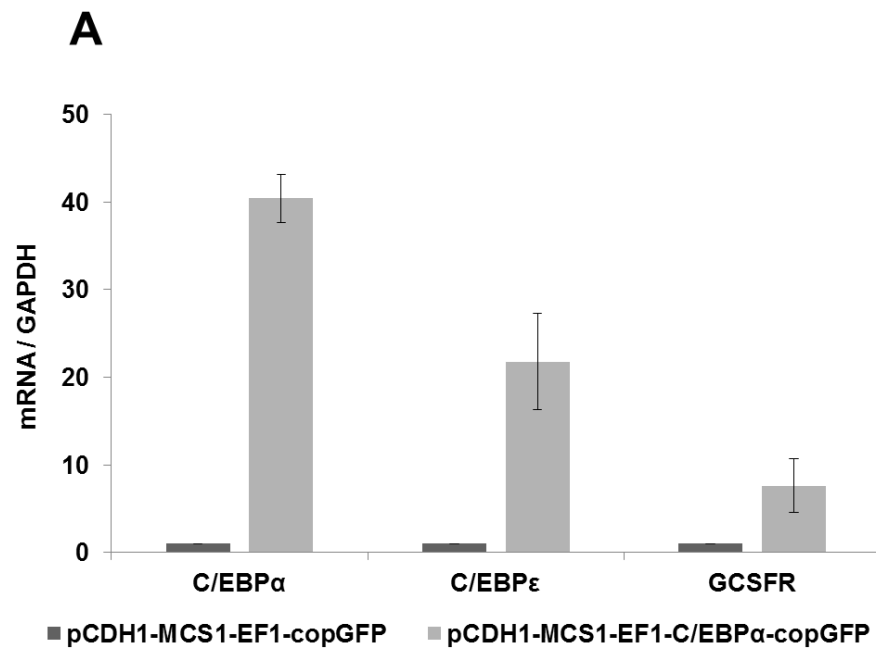
2.2.20 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde der Student *t* Test für abhängige und unverbundene Stichproben verwendet (Excel). Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p kleiner als 5 % ($p \leq 0.05$) wurde das Ergebnis als statistisch signifikant gewertet. Wurde dieses Niveau erreicht, sind die Werte in den Abbildungen durch Sterne gekennzeichnet: $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **. Die Ergebnisse wurden bei mehr als zwei unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Balkendiagramme wurden mit Excel und die Box-Whisker- Plots mit SPSS 17 erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung C/EBP α -regulierter miRNAs mittels Microarray

C/EBP α ist ein essentieller Transkriptionsfaktor in der Granulopoese und auch Monopoese⁴³⁻⁴⁴. Es konnten bereits verschiedene durch C/EBP α regulierte miRNAs identifiziert werden, wie die miR-223¹³⁷⁻¹³⁹. Allerdings wurde bisher kein microRNA-Expressionsprofil spezifisch für C/EBP α -regulierte miRNAs in der granulozytären Differenzierung publiziert. Um ein miRNA-Expressionsprofil spezifisch für C/EBP α -regulierte miRNAs zu erstellen, wurde mit Hilfe eines MicroRNA-Arrays die Expression der miRNAs in der humanen chronisch myeloischen Leukämiezelllinie K562 ermittelt. Da K562 Zellen selbst kein endogenes C/EBP α exprimieren, wurden die Zellen zuvor lentiviral mit einem C/EBP α -Überexpressionkonstrukt stabil transduziert. Als Kontrollexperiment wurden K562 Zellen lentiviral mit einem Kontrollvektor ohne C/EBP α transduziert. Sieben Tage nach der lentiviralen Transduktion wurde mittels quantitativer Real-Time PCR (Abbildung 4A) und semiquantitativer PCR (Abbildung 4B) die Expression von C/EBP α sowie dessen zwei direkten Zielgene G-CSF-Rezeptor⁴⁹ und C/EBP ϵ ⁴⁵, welche während der granulozytären Differenzierung durch C/EBP α angeschaltet werden, gemessen. Die Zellen exprimieren nach der lentiviralen Transduktion sowohl C/EBP α als auch C/EBP ϵ und den G-CSF-Rezeptor (Abbildung 4), was zeigt, dass in den Zellen das Differenzierungsprogramm der Granulopoese angeschaltet wurde.



B

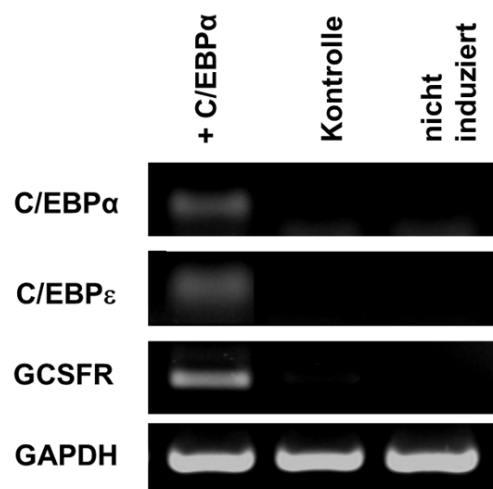


Abbildung 4: Expression von C/EBPα, C/EBPε und GCSFR nach lentiviraler Überexpression von C/EBPα. Die RNA wurde nach sieben Tagen isoliert und mittels quantitativer Real-Time PCR (A) und semiquantitativer PCR (B) mit spezifischen Primern für C/EBPα, C/EBPε und GCSFR analysiert. (A) Die Werte wurden zum ebenfalls gemessenen GAPDH normalisiert. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung des jeweiligen mRNA/GAPDH Verhältnisses von jeweils drei unabhängigen Experimenten. (Abkürzungen: + C/EBPα: lentivirale Überexpression von C/EBPα)

Sieben Tage nach der lentiviralen Überexpression von C/EBP α wurde mittels miRCURY™ LNA microRNA-Array (EXIQON A/S) ein Expressionsprofil der durch C/EBP α -regulierten miRNAs erstellt. Aus den Expressionswerten (Hy5/Hy3) der vier Spots (technische Replikate) des microRNA-Arrays wurden die Mittelwerte sowie Standardabweichungen (STABW) der Expression aller identifizierten miRNAs berechnet. Von den 454 gespotteten miRNAs wurden insgesamt 200 detektiert, welche eine unterschiedliche Expression gegenüber den nicht C/EBP α -exprimierenden Zellen aufweisen (Tabelle 4). Durch die exogene Expression von C/EBP α werden 24 miRNAs hochreguliert (Expression $\geq 1,1$) sowie 176 herunterreguliert (Expression $< 0,9$). Von diesen herunterregulierten miRNAs sind 20 miRNAs fast vollständig geblockt (Expression $< 0,2 \pm$ STABW). Zusätzlich wurden vier miRNAs identifiziert, die wiederum keinen Unterschied in ihrer Expression durch C/EBP α zeigen (Expression zwischen 1,1 und $0,9 \pm$ STABW). Unter den nicht durch C/EBP α -regulierten miRNAs befindet sich auch die RNA U6 small nuclear 2 (RNU6B = U6), welche deshalb in den quantitativen Real-Time-PCRs zur Normalisierung verwendet wird.

Tabelle 4: Expression von C/EBP α -regulierten miRNAs. Die RNA wurde sieben Tage nach Virusinfektion isoliert und zur Analyse C/EBP α regulierter miRNAs mittels eines miRCURY™ LNA microRNA Array genutzt. Dargestellt ist die relative Expression der hochregulierten (rot), nicht regulierten (gelb) und herunterregulierten (blau) miRNAs im Vergleich zum Kontroll- bzw. Vergleichsexperiment. Die Mittelwerte und Standardabweichungen (STABW) errechnen sich aus den vier Spots (technische Replikate) des MicroRNA Arrays. (Abkürzungen: hsa: *homo sapiens*)

	Mittelwert	STABW		Mittelwert	STABW
hsa-miR-30c	3,47	0,92	hsa-miR-671-5p	1,22	0,10
hsa-let-7a	3,05	0,97	hsa-miR-301a	1,20	0,40
hsa-miR-572	3,01	0,11	hsa-miR-142-3p	1,17	0,22
hsa-miR-494	2,92	0,44	hsa-miR-16	1,16	0,34
hsa-miR-15b	2,82	0,58	hsa-miR-320	1,11	0,15
hsa-miR-378	2,69	1,27	hsa-miR-30b	1,10	0,10
hsa-miR-26a	2,46	0,26	hsa-miR-185	1,08	0,07
hsa-miR-583	2,33	0,22	U6-snRNA-2	1,01	0,20
hsa-miR-612	1,93	0,08	hsa-miR-126	0,95	0,18
hsa-miR-663	1,88	0,09	hsa-miR-130b	0,94	0,21
hsa-miR-223	1,87	0,12	hsa-miR-18b	0,87	0,04
hsa-miR-21	1,82	0,70	hsa-miR-593*	0,87	0,36
hsa-miR-658	1,63	0,55	hsa-miR-106b	0,85	0,08
hsa-miR-146b-5p	1,44	0,09	hsa-miR-106a/17	0,83	0,07
hsa-miR-191	1,42	0,21	hsa-miR-20a	0,83	0,15
let-7a-e	1,41	0,10	hsa-miR-515-3p	0,82	0,51
hsa-miR-23a	1,27	0,25	hsa-miR-18a	0,80	0,09
hsa-miR-142-5p	1,26	0,06	hsa-miR-376a	0,76	0,05

hsa-miR-425*	0,74	0,03	hsa-miR-125b	0,47	0,18
hsa-miR-380*	0,74	0,18	hsa-miR-571	0,46	0,19
hsa-miR-640	0,72	0,47	hsa-miR-217	0,46	0,29
hsa-miR-374b	0,70	0,26	hsa-miR-329	0,45	0,34
hsa-miR-490-3p	0,70	0,16	hsa-miR-542-3p	0,45	0,02
hsa-miR-132	0,70	0,14	hsa-miR-520g/520h	0,45	0,12
hsa-miR-383	0,69	0,18	hsa-miR-99b	0,45	0,13
hsa-miR-451	0,67	0,07	hsa-miR-378*	0,44	0,19
hsa-miR-519c-3p	0,67	0,31	hsa-miR-31	0,44	0,05
hsa-miR-505	0,67	0,07	hsa-miR-424	0,44	0,10
hsa-miR-130a	0,67	0,15	hsa-miR-299-3p	0,44	0,23
hsa-miR-219-5p	0,66	0,17	hsa-miR-367	0,44	0,44
hsa-miR-342-3p	0,64	0,08	hsa-miR-339-5p	0,44	0,11
hsa-miR-30a*	0,64	0,08	hsa-miR-199a-3p/199b-3p	0,43	0,14
hsa-miR-381	0,64	0,19	hsa-miR-205	0,43	0,09
hsa-miR-519d	0,64	0,29	hsa-miR-629*	0,43	0,00
hsa-miR-28-5p	0,64	0,02	hsa-let-7g	0,43	0,13
hsa-miR-589*	0,64	0,13	hsa-miR-602	0,43	0,04
hsa-let-7e	0,62	0,06	hsa-miR-518a-5p/527	0,43	0,04
hsa-miR-496	0,62	0,19	hsa-miR-590-5p	0,43	0,38
hsa-miR-661	0,62	0,10	hsa-miR-409-3p	0,43	0,33
hsa-miR-222	0,62	0,21	hsa-miR-154*	0,42	0,05
hsa-miR-511	0,62	0,19	hsa-miR-595	0,42	0,11
hsa-miR-635	0,61	0,32	hsa-miR-148b	0,42	0,38
hsa-miR-195	0,60	0,19	hsa-miR-431	0,42	0,14
hsa-miR-520b/520c-3p	0,59	0,11	hsa-miR-410	0,42	0,16
hsa-miR-577	0,59	0,35	hsa-miR-127-3p	0,41	0,34
hsa-miR-328	0,59	0,18	hsa-miR-126*	0,41	0,22
hsa-miR-563	0,58	0,20	hsa-miR-105	0,40	0,09
hsa-miR-613	0,58	0,35	hsa-miR-143	0,40	0,28
hsa-miR-560	0,58	0,29	hsa-miR-607	0,40	0,13
hsa-miR-215	0,58	0,11	hsa-miR-139-5p	0,39	0,17
hsa-miR-493	0,57	0,13	hsa-miR-27a	0,39	0,17
hsa-miR-20b	0,57	0,23	hsa-miR-30d	0,39	0,07
hsa-let-7d	0,56	0,13	hsa-miR-411	0,39	0,11
hsa-miR-543	0,56	0,19	hsa-miR-621	0,39	0,28
hsa-miR-598	0,56	0,15	hsa-miR-520a-3p	0,38	0,35
hsa-miR-662	0,55	0,19	hsa-miR-549	0,37	0,11
hsa-miR-7	0,53	0,32	hsa-miR-331-3p	0,37	0,10
hsa-miR-34b*	0,53	0,13	hsa-miR-516b	0,37	0,24
hsa-let-7f	0,52	0,18	hsa-miR-346	0,36	0,23
hsa-miR-18a*	0,52	0,17	hsa-miR-520a-5p	0,36	0,09
hsa-miR-299-5p	0,51	0,12	hsa-miR-432*	0,36	0,12
hsa-miR-487b	0,51	0,05	hsa-miR-606	0,35	0,08
hsa-miR-181a*	0,50	0,26	hsa-miR-200a*	0,35	0,13
hsa-miR-488*	0,50	0,11	hsa-miR-373	0,34	0,12
hsa-miR-429	0,50	0,18	hsa-miR-542-5p	0,34	0,20
hsa-miR-325	0,50	0,28	hsa-miR-515-5p	0,34	0,14
hsa-miR-22*	0,49	0,45	hsa-miR-199b-5p	0,34	0,20
hsa-miR-601	0,49	0,29	hsa-miR-99a	0,34	0,26
hsa-miR-654-5p	0,49	0,05	hsa-miR-374a	0,25	0,22
hsa-miR-100	0,48	0,30	hsa-miR-150	0,25	0,20

hsa-miR-214	0,48	0,17	hsa-miR-516a-3p/516b*	0,24	0,23
hsa-miR-24	0,33	0,19	hsa-miR-512-3p	0,24	0,30
hsa-miR-376c	0,33	0,06	hsa-miR-422a	0,24	0,37
hsa-miR-544	0,33	0,15	hsa-miR-649	0,24	0,19
hsa-miR-24-1*/24-2*	0,33	0,10	hsa-miR-499-5p	0,23	0,12
hsa-miR-582-5p	0,33	0,13	hsa-miR-610	0,23	0,13
hsa-miR-141	0,32	0,22	hsa-miR-206	0,23	0,20
hsa-miR-372	0,31	0,15	hsa-miR-518c	0,23	0,03
hsa-miR-369-5p	0,31	0,09	hsa-miR-423-3p	0,23	0,30
hsa-miR-521	0,31	0,11	hsa-miR-10b	0,22	0,11
hsa-miR-193b	0,31	0,12	hsa-miR-624*	0,21	0,34
hsa-miR-92a	0,31	0,22	hsa-miR-655	0,21	0,19
hsa-miR-551b	0,30	0,29	hsa-miR-9*	0,20	0,04
hsa-miR-489	0,30	0,11	hsa-miR-433	0,18	0,20
hsa-miR-188-5p	0,30	0,11	hsa-miR-639	0,17	0,15
hsa-miR-454	0,30	0,09	hsa-miR-506	0,17	0,05
hsa-miR-641	0,30	0,13	hsa-miR-523	0,17	0,15
hsa-miR-199a-5p	0,29	0,19	hsa-miR-29b	0,16	0,14
hsa-miR-448	0,29	0,12	hsa-miR-552	0,16	0,13
hsa-miR-605	0,28	0,12	hsa-miR-32	0,16	0,12
hsa-miR-636	0,28	0,16	hsa-miR-181a	0,15	0,04
hsa-miR-34c-5p	0,28	0,15	hsa-miR-514	0,14	0,09
hsa-miR-569	0,27	0,14	hsa-miR-221	0,13	0,09
hsa-miR-548d-3p	0,26	0,15	hsa-miR-660	0,12	0,09
hsa-miR-518e	0,26	0,24	hsa-miR-597	0,11	0,10
hsa-miR-565	0,25	0,12	hsa-miR-330-3p	0,11	0,09
hsa-miR-625	0,25	0,09	hsa-miR-200b	0,11	0,03
hsa-miR-578	0,25	0,06	hsa-miR-95	0,09	0,07
hsa-miR-30e*	0,25	0,32	hsa-miR-620	0,09	0,12
hsa-miR-29c	0,24	0,18	hsa-miR-622	0,08	0,11
hsa-miR-421	0,24	0,08	hsa-miR-609	0,08	0,08
hsa-miR-633	0,24	0,18	hsa-miR-501-5p	0,05	0,05

Da es sich bei dem durchgeführten microRNA-Array nur um ein initiales Experiment handelt, wurde die Genauigkeit der *Microarray*-basierten Messung anschließend validiert. Mit Hilfe der quantitativer Real-Time PCR wurde die Expression der hsa-miR-30c, hsa-miR-15b, hsa-miR-223, hsa-miR-21, hsa-miR-191, hsa-miR-23a, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-106b, und hsa-miR-20a gemessen und zum *Microarray* verglichen (Abbildung 5). Als endogene Kontrolle wurde die U6 verwendet. Bei der Analyse mittels quantitativer Real-Time PCR wiesen sechs miRNAs (hsa-miR-30c, hsa-miR-15b, hsa-miR-223, hsa-miR-21, hsa-miR-23a, und miR-20a) dieselbe Regulationstendenz auf wie im *Microarray*. Die hsa-miR-15b zeigt allerdings mittels quantitativer Real-Time PCR nur noch eine geringe Hochregulation im Vergleich zum *Microarray*. Für die miRNAs hsa-miR-191, hsa-miR-142-3p und hsa-miR-106b konnten die Ergebnisse sowie folglich die Regulations-

tendenzen des *Microarrays* mittels quantitativer Real-Time PCR (QPCR) nicht bestätigt werden.

Für weitere genauere Analysen und die funktionelle Charakterisierung wurde eine, für die Granulopoese bisher noch nicht beschriebene miRNA, gewählt. Für die miR-30c konnte bereits in anderen Untersuchungen gezeigt werden, dass sie in verschiedenen Zelltypen des hämatopoetischen Systems exprimiert wird¹⁵³ und eine tumorsuppressive Wirkung bei akuter myeloischer Leukämie mit *NPM1* Mutationen hat¹⁵². Allerdings wurde die miR-30c bisher noch nicht genauer im hämatopoetischen System betrachtet und charakterisiert.

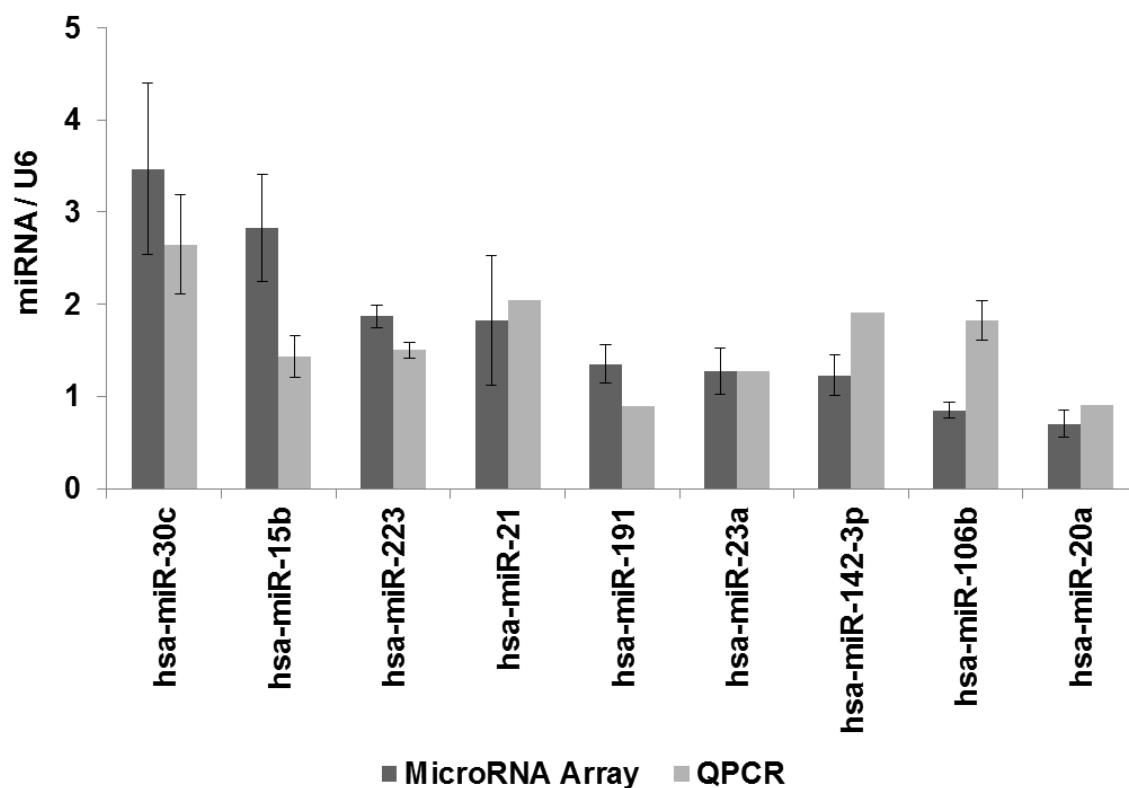


Abbildung 5: Vergleich der Ergebnisse von MicroRNA Array und quantitativer Real-Time PCR nach lentiviraler Überexpression von C/EBP α . Die gesamte RNA wurde nach 7 Tagen isoliert und mittels quantitativer Real-Time PCR mit spezifischen Primern für hsa-miR-30c, hsa-miR-15b, hsa-miR-223, hsa-miR-21, hsa-miR-191, hsa-miR-23a, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-106b, und hsa-miR-20a analysiert (helle Balken). Die Werte wurden zur ebenfalls gemessenen U6 normalisiert. Die hellen Balken repräsentieren bei der hsa-miR-30c, hsa-miR-15b, hsa-miR-223 und hsa-miR-106b jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung des miRNA/U6 Verhältnisses von jeweils drei unabhängigen Experimenten. Bei hsa-miR-21, hsa-miR-191, hsa-miR-23a, hsa-miR-142-3p und hsa-miR-20a repräsentiert der Balken nur ein Experiment. Der dunklen Balken ist bei allen dargestellten miRNAs das Ergebnis des miRCURY™ LNA microRNA Arrays mit der Standardabweichung der 4 Spots (technischen Replikate) zum Vergleich. (Abkürzungen: hsa: *homo sapiens*, QPCR: quantitative Real-Time PCR)

3.2 C/EBP α -p42 reguliert die miR-30c während der granulozytären Differenzierung

Die miR-30c wird in myeloiden sowie lymphoiden Zellen, vor allem aber in neutrophilen Granulozyten, hoch exprimiert^{153,165}. Um die Regulation der miR-30c durch C/EBP α während der Granulopoese zu verifizieren, wurde die Expression der miR-30c in verschiedene Zelllinienexperimente gemessen. Zum einen wurden K562 Zellen mit einem Lentivirus, welcher C/EBP α exprimiert, transduziert (Abbildung 4). Mittels quantitativer Real-Time-PCR konnte nach sieben Tagen ein signifikanter Anstieg der miR-30c gemessen werden (Abbildung 6). Parallel wurde auch die Expression der miR-223 gemessen, welche spezifisch für die Granulopoese ist und während der granulozytären Differenzierung durch C/EBP α induziert wird¹³⁶⁻¹³⁷. Wie erwartet, zeigt die miR-223 ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression nach C/EBP α -Überexpression (Abbildung 6).

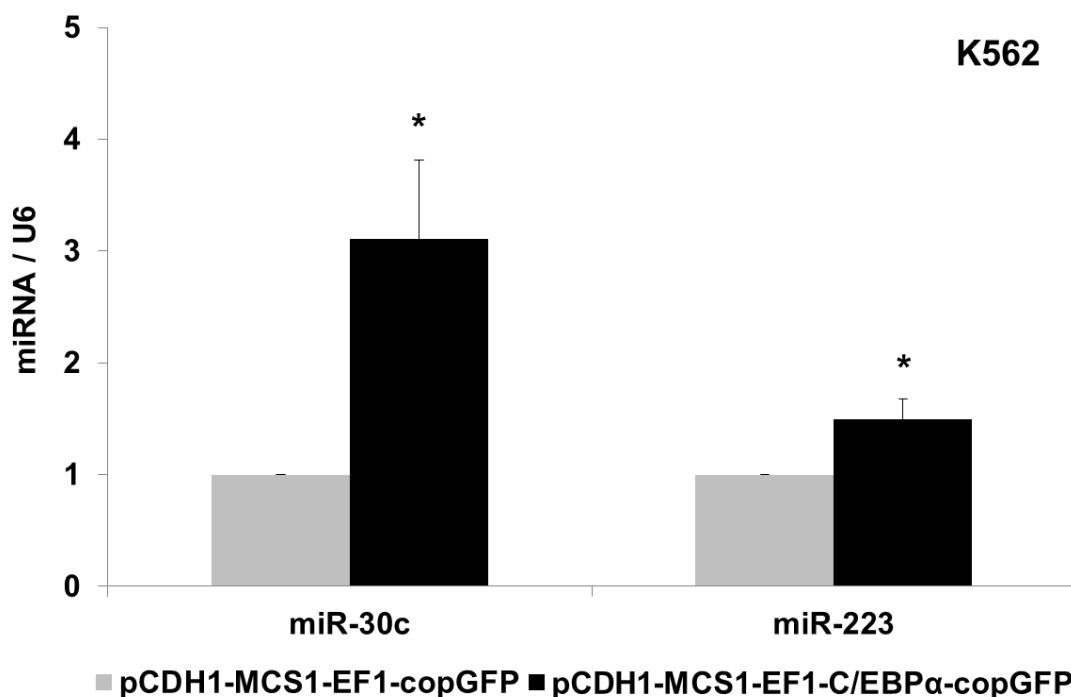


Abbildung 6: Induktion der miR-30c und miR-223 durch lentivirale Überexpression von C/EBP α in K562 Zellen. Die RNA wurde nach 7 Tagen isoliert und mittels quantitativer Real-Time PCR mit spezifischen Primern für miR-30c und miR-223 analysiert. Die Werte wurden zur ebenfalls gemessenen U6 normalisiert. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung des miRNA/U6 Verhältnisses von jeweils drei unabhängigen Experimenten (* $p \leq 0,05$).

Da bei der Translation der *CEBPA*-mRNA zwei verschiedenen Isoformen, C/EBP α -p42 und C/EBP α -p30, gebildet werden³⁸, wurde der Einfluss dieser zwei Proteine auf die Expression der miR-30c untersucht. Dafür wurde das induzierbare Zelllinienmodell K562-C/EBP α -ER verwendet. Die Zelllinie K562 wurde von einem Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie in Blastenkrise etabliert. Aufgrund der Translokation t(9;22) und dem daraus entstehendem Fusionsprotein BCR-ABL exprimieren diese Zellen kein endogenes C/EBP α . Mit Hilfe eines lentiviralen Vektors wurde ein künstliches Fusionsgen aus den Genen für den Transkriptionsfaktor C/EBP α (die Wildtyp-Form p42, wie auch die Mutante p30) und dem Estrogenrezeptor (ER) in die Zelle transduziert. Somit liegt C/EBP α inaktiv im Zytoplasma vor und kann erst nach Behandlung mit einem Liganden für den Estrogenrezeptor, z.B. β -Estradiol oder Tamoxifen, in den Kern eindringen und seine Zielgene aktivieren und die granulozytäre Differenzierung induzieren. Die Transaktivierung von C/EBP α führt innerhalb kürzester Zeit dazu die K562-C/EBP α -p42ER Zellen differenzieren zu lassen¹⁵⁶. Die Zelllinie dient deshalb als ideales Werkzeug zur Untersuchung von C/EBP α und seinen Zielgenen. Für die Untersuchung der durch C/EBP α induzierten miR-30c wurden die Expressionslevel nach unterschiedlicher Behandlungsdauer der K562-C/EBP α -p42ER Zellen bzw. K562-C/EBP α -p30ER Zellen mit β -Estradiol mittels quantitativer Real-Time PCR analysiert. Es zeigte sich ein schneller und signifikanter Anstieg der miR-30c Expression nach 2-, 6- und 12-stündiger Behandlung der K562-C/EBP α -p42ER Zellen (Abbildung 7A). Bei der Behandlung der K562-C/EBP α -p30ER Zellen mit β -Estradiol zeigte sich bei gleicher Behandlungsdauer keine Veränderung der miR-30c Expression (Abbildung 7B). Die Zelllinie K562-ER diente als Kontrolle, da sie kein Fusionsgen mit aktivierbarem C/EBP α trägt. Bei der Behandlung dieser Zellen mit β -Estradiol wurde ebenfalls keine Änderung im Expressionslevel der miR-30c analysiert (Abbildung 7C).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Hochregulation der miR-30c während der frühen granulozytären Differenzierung eine spezifische Funktion der C/EBP α Isoform p42 ist, und nicht durch die verkürzte Isoform C/EBP α -p30 reguliert wird.

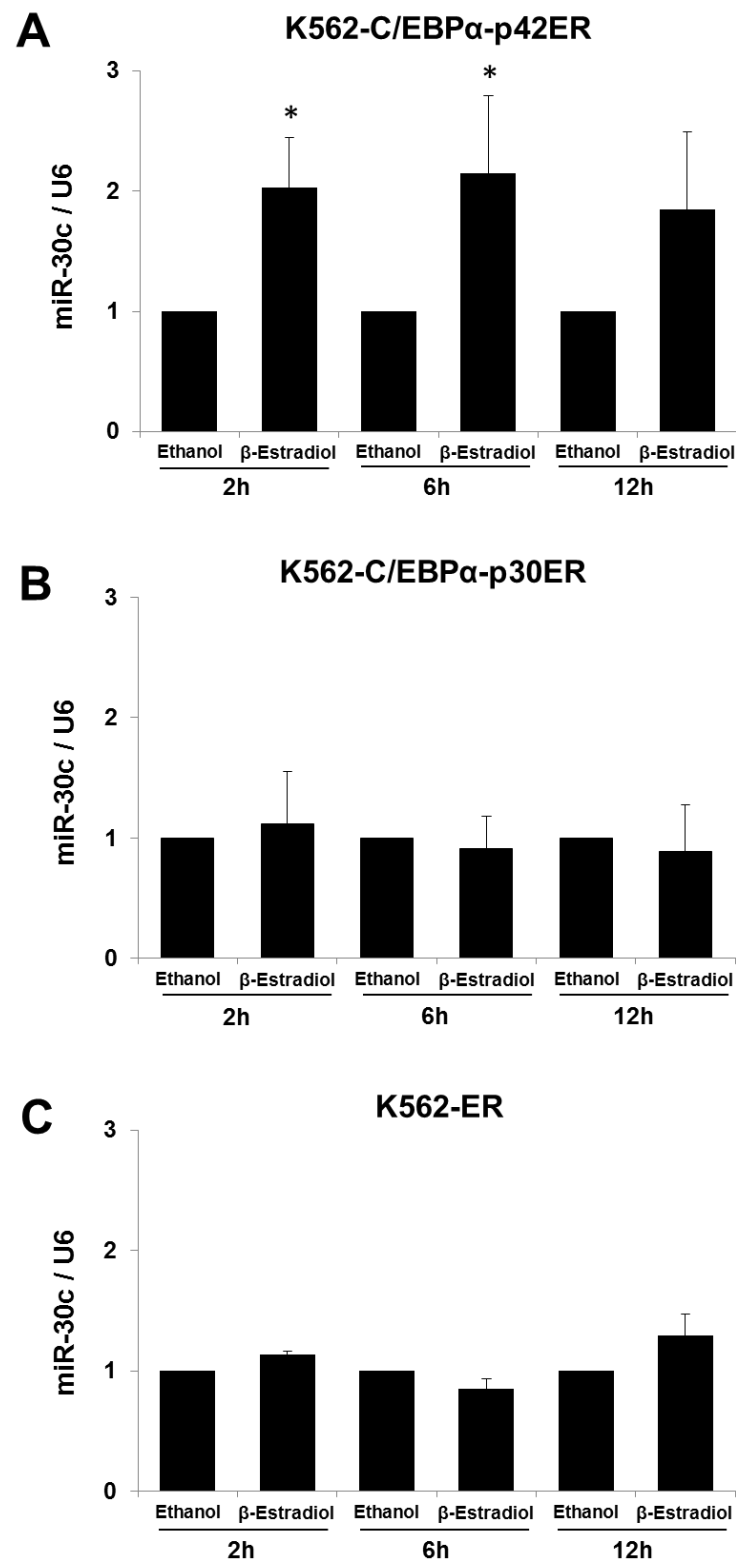


Abbildung 7: Induktion der miR-30c durch C/EBP α -p42. (A) K562-C/EBP α -p42ER, (B) K562-C/EBP α -p30ER und (C) K562-ER Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit β -Estradiol (5 μ M) behandelt. Die RNA wurde isoliert und mittels quantitativer Real-Time PCR mit spezifischen Primern für miR-30c analysiert. Die Werte wurden zur U6 normalisiert. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung des miR-30c/U6 Verhältnisses von jeweils drei unabhängigen Experimenten (* $p \leq 0,05$).

Zum weiteren Verständnis der Regulation der miR-30c in der Granulozyten-differenzierung wurden die Expressionslevel der miRNA in U937 Zellen während der Behandlung mit *all-trans*-Retinsäure (ATRA) analysiert. Die durch ATRA-induzierte granulozytäre Differenzierung in U937 Zellen führt zu einer sehr hohen Expression von C/EBP α ⁴⁵. Eine Analyse der miR-30c Expression mittels quantitativer Real-Time PCR zeigt, dass ATRA in diesem System ebenfalls zu einer Induktion und Hochregulation der miR-30c Expression nach 24-, 48- und 72-stündiger Behandlung führt (Abbildung 8A).

Des Weiteren wurde die Expression der miR-30c während der Granulopoese von primären humanen CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen untersucht. Die CD34+ Zellen wurden mit G-CSF behandelt, welcher die granulozytäre Differenzierung in diesen Zellen induziert¹⁵⁷, und für 7 bzw. 14 Tage kultiviert. Während der Differenzierung von primären humanen CD34+ Vorläuferzellen zu Granulozyten konnte wie in den Zelllinienexperimenten (Abbildung 6, Abbildung 7A und Abbildung 8A) eine Induktion sowie Hochregulation der miR-30c Expression beobachtet werden (Abbildung 8B).

Zusammenfassend lässt sich zeigen, dass die Expression der miR-30 während der Granulopoese hochreguliert wird. Die Wildtypform C/EBP α -p42, aber nicht die Mutante C/EBP α -p30, führt zur Induktion und Exprimierung der miR-30c während der granulozytären Differenzierung.

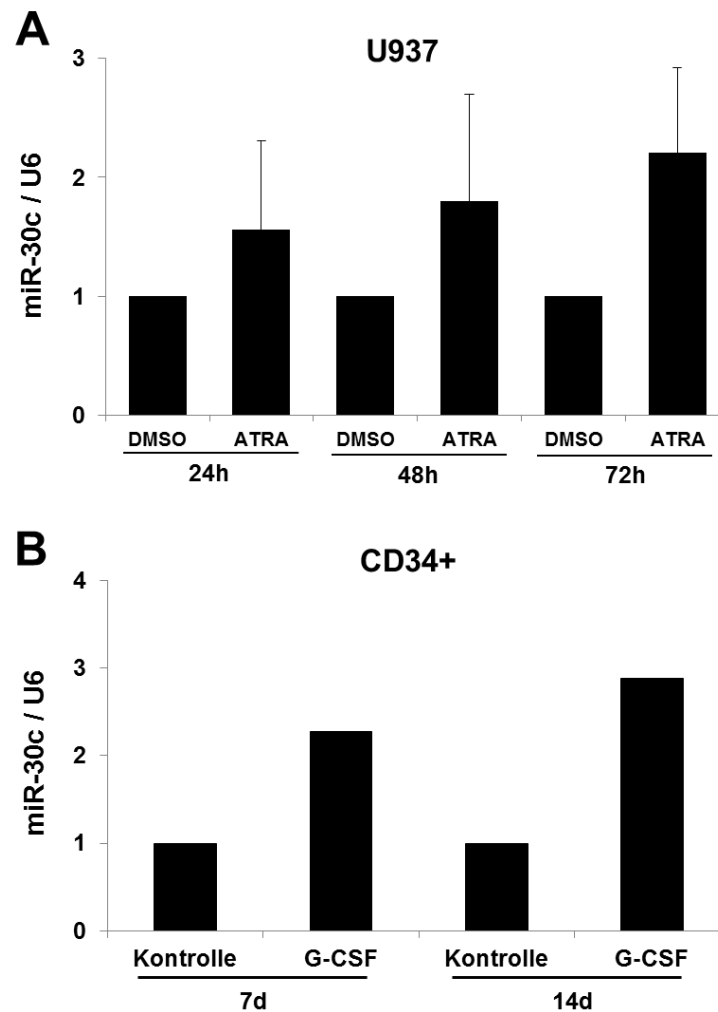


Abbildung 8: Induktion der miR-30c durch ATRA- und G-CSF-induzierte granulozytäre Differenzierung. (A) U937 Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit ATRA (1µM) und **(B)** CD34+ Zellen wurden mit 100ng/µl G-CSF behandelt. Die RNA wurde zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert und mittels quantitativer Real-Time PCR mit spezifischen Primern für die miR-30c analysiert. Die Werte wurden zur U6 und zur Kontrolle normalisiert. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung des miR-30c/U6 Verhältnisses von jeweils drei **(A)** bzw. zwei **(B)** unabhängigen Experimenten.

3.3 Expression der miR-30c in AML-Patientenproben

In der Leukämogenese kommt es durch die Dysfunktion oder das Fehlen regulierender Faktoren wichtiger Differenzierungsvorgänge zu Regulationsstörungen. In der AML resultiert ein früher Differenzierungsblock der myeloiden Vorläuferzellen in einer Akkumulation von Blasten im Knochenmark sowie dem peripheren Blut. Bei der Entstehung einer AML sind am häufigsten Transkriptionsfaktoren dereguliert⁶. C/EBPα ist ein Transkriptionsfaktor, welcher in verschiedenen Subtypen der

AML dereguliert ist. Verschiedene Translokationen einiger AML-Subtypen^{57,64}, Onkogene^{57,65} sowie Mutationen von *FLT3*⁶²⁻⁶³ und *CEBPA* selbst^{56,59-61} führen unter anderem zur Inhibierung der Tumorsuppressoraktivität von C/EBP α .

Aber auch weitere regulatorische Faktoren wie miRNAs spielen eine entscheidende Rolle bei der malignen Transformation und Pathogenese. Mehr als die Hälfte aller miRNAs liegen in genomischen Regionen, welche beim Menschen mit Krebserkrankungen assoziiert sind¹⁶⁶, außerdem konnten verschiedene Studien zeigen, dass die miRNA Expression in humanen Tumoren, einschließlich hämatopoetischer Erkrankungen, häufig dereguliert ist. miRNAs können so bei der Entwicklung von Krebs entweder als Onkogen (oncomir) oder Tumorsuppressor mitwirken¹⁶⁷⁻¹⁷⁰. Umfassende miRNA-Expressionsprofile zeigen häufiger eine Reduktion bestimmter miRNAs in den meisten malignen Erkrankungen im Vergleich zu gesundem Gewebe¹⁶⁸. Diese gehemmte Expression der miRNAs in malignem Gewebe deutet darauf hin, dass es sich bei diesen miRNAs um Tumorsuppressoren handelt, deren Fehlen einen begünstigenden Einfluss auf die maligne Transformation hat. Für die miR-30c konnten bereits andere Arbeitsgruppen eine reduzierte Expression in leukämischen Zellen von AML Patienten zeigen¹⁷¹⁻¹⁷².

3.3.1 Expression der miR-30c in verschiedenen AML-Subtypen

In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die miR-30c durch die Wildtypform C/EBP α -p42 reguliert wird und nicht durch die Mutante p30, welche mit AML assoziiert wird (Abbildung 7). Deshalb stellte sich die Frage, ob eine reduzierte bzw. geblockte C/EBP α -Funktion auch mit einer verminderten miR-30c Expression einhergeht.

In 27 diagnostischen Proben von AML Patienten wurden die Expressionslevel der miR-30c untersucht (Tabelle 2). Das Patientenprobenset setzt sich aus folgenden AML-Subtypen zusammen: jeweils sieben Proben von Patienten mit zytogenetisch normalem Karyotyp (NK-AML) als auch AML mit inv(16), jeweils fünf Proben von Patienten mit zytogenetisch komplexem Karyotyp (CK-AML) sowie AML mit t(8;21) sowie drei AML-Patientenproben mit t(15;17). Als Kontroll- bzw. Vergleichsgruppe dienten die Proben von drei gesunden Spendern. Bei der Analyse der miR-30c Expression mittels quantitativer Real-Time PCR bestätigte sich die Annahme, dass die Expressionslevel der miR-30c in den AML-Subtypen mit fehlregulierter

C/EBP α -Funktion vermindert ist. In allen AML Subtypen, mit Ausnahme der AML-Patientenproben mit t(15;17), zeigte sich im Vergleich zu den gesunden Spendern ein z.T. hoch signifikant reduziertes Expressionslevel der miR-30c (Abbildung 9).

Die genetischen und morphologischen Merkmale der untersuchten AML Patientenproben sind in Tabelle 2 aufgeführt.

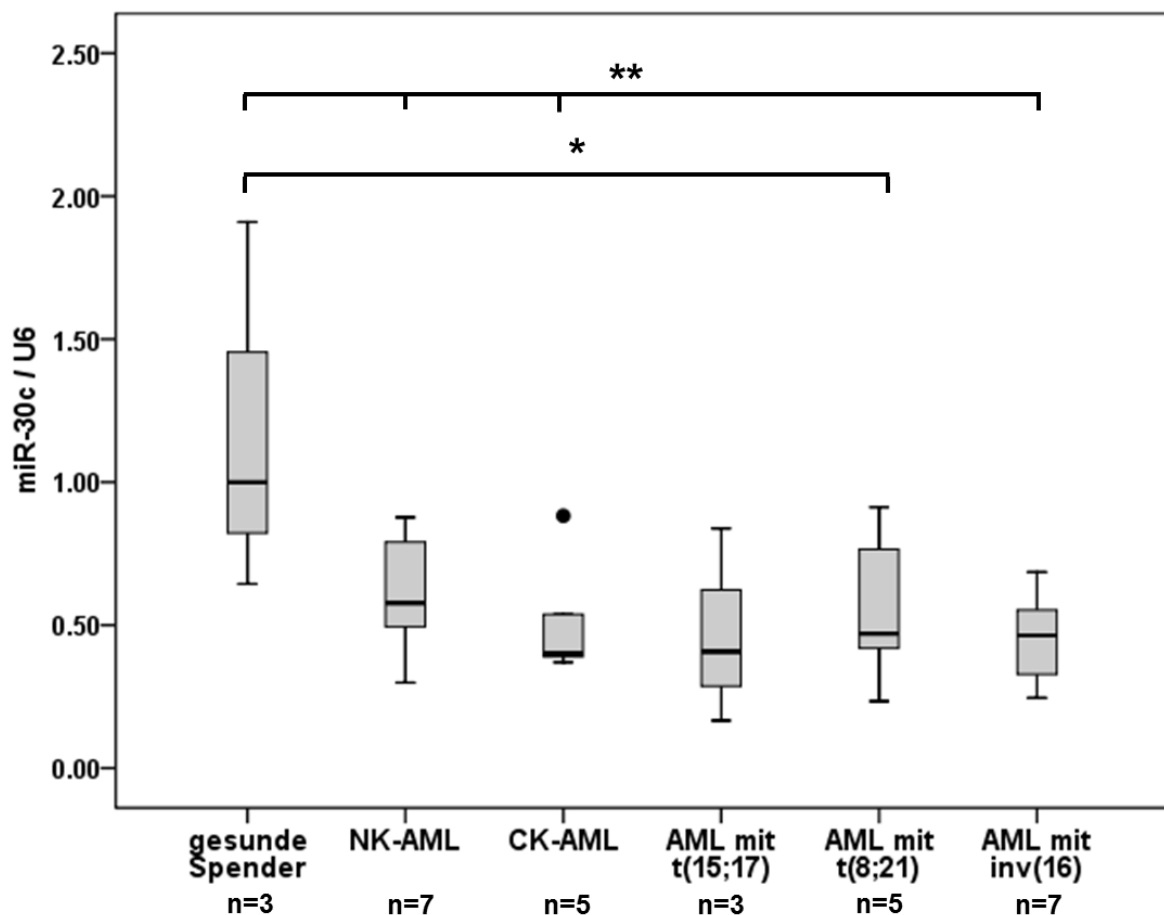


Abbildung 9: Reduzierte Expression der miR-30c in verschiedenen Subgruppen der AML. In isolierter RNA aus Knochenmarkszellen von AML Patientenproben (n=30) und gesunden Spendern (n=3) wurde das Expressionslevel der miR-30c mittels quantitativer Real-Time PCR mit spezifischen Primern untersucht. Die Werte wurden zur U6 normalisiert und anschließend zum Expressionslevel der gesunden Spender verglichen. (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$).

3.3.2 Expression der miR-30c in NK-AML Patientenproben mit *CEBPA*-Mutationen

C/EBP α wird auch durch seine eigenen Mutationen dereguliert⁶⁰. Zudem ist bereits bekannt, dass *CEBPA* Mutationen überwiegend bei AML mit zytogenetisch normalem Karyotyp (NK-AML) vorkommen⁵⁵⁻⁵⁶. Deshalb wurde für weitere 12 NK-AML-Patientenproben, mit jeweils 4 Proben mit monoallelischer und biallelischer *CEBPA* Mutation bzw. ohne *CEBPA* Mutation, das Expressionslevel der miR-30c analysiert. Die genetischen und morphologischen Merkmale der untersuchten NK-AML Patientenproben sind in

Tabelle 3 aufgeführt.

Bei der Untersuchung der miR-30c Expression bestätigte sich auch hier die Annahme, dass die Expressionslevel der miRNA durch die *CEBPA* Mutation vermindert werden. Im Vergleich zu NK-AML ohne *CEBPA* Mutation zeigten die Proben mit monoallelischer *CEBPA* Mutation eine nur leichte und nicht signifikante Verminderung der miR-30c Expression, während die Proben mit biallelischer *CEBPA* Mutation eine sehr deutliche signifikante Reduktion der miRNA (Abbildung 10) aufwiesen. Ebenso gibt es einen eindeutigen signifikanten Unterschied zwischen den Patientenproben mit mono- und biallelischer *CEBPA* Mutation.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die miR-30c Expression in AML-Patientenproben mit verminderter bzw. geblockter C/EBP α -Funktion reduziert ist. Dies konnte vor allem bei NK-AML-Proben mit biallelischer *CEBPA* Mutation gezeigt werden.

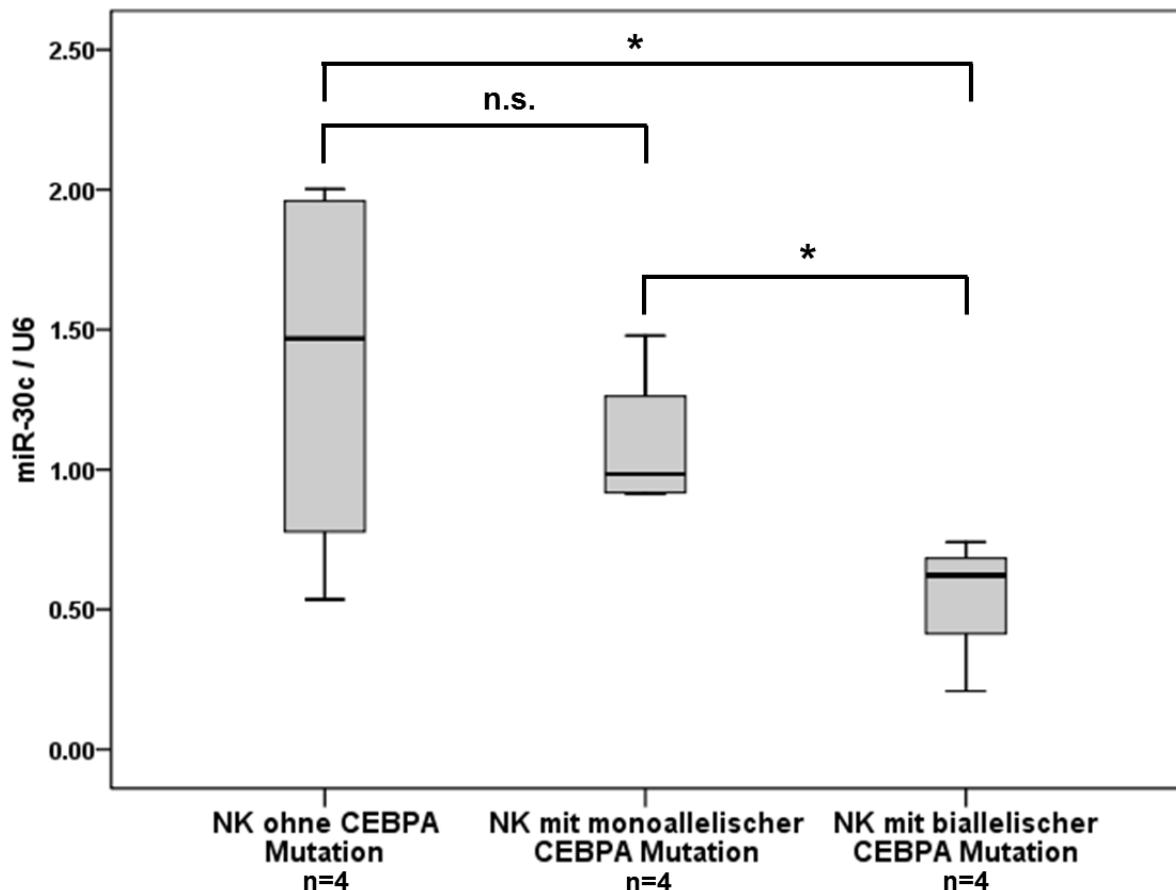


Abbildung 10: Reduzierte Expression der miR-30c in NK-AML Patientenproben mit CEBPA-Mutationen. Die Expressionslevel der miR-30c wurden mittels quantitativer Real-Time PCR mit spezifischen Primern in isolierter RNA aus Knochenmarkszellen von NK-AML-Patienten mit monoallelischer (n=4), biallelischer (n=4) und ohne CEBPA Mutation (n=4) untersucht. Die Werte wurden normalisiert zur U6 und anschließend zum Expressionslevel AML Proben ohne CEBPA Mutation. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung des miR-30c/U6 Verhältnisses von der jeweiligen Patientenprobenzahl. (* $p \leq 0,05$).

3.4 Expression der miR-30c *in vivo*

Da bereits *in vitro* gezeigt werden konnte, dass die miR-30c durch C/EBP α in der frühen granulozytären Differenzierung hoch exprimiert wird (Abbildung 7 und Abbildung 8), sollte auch die Expression der miRNA *in vivo* näher betrachtet werden. Es wurde bereits gezeigt, dass C/EBP α vor allem für die Differenzierung von CMPs zu GMPs benötigt wird und anschließend nicht mehr für die granulozytäre Differenzierung erforderlich ist⁴⁶. Aufgrund dessen könnte man eine hohe Expression der miR-30c in den Vorläuferpopulationen wie CMP und GMP vermuten.

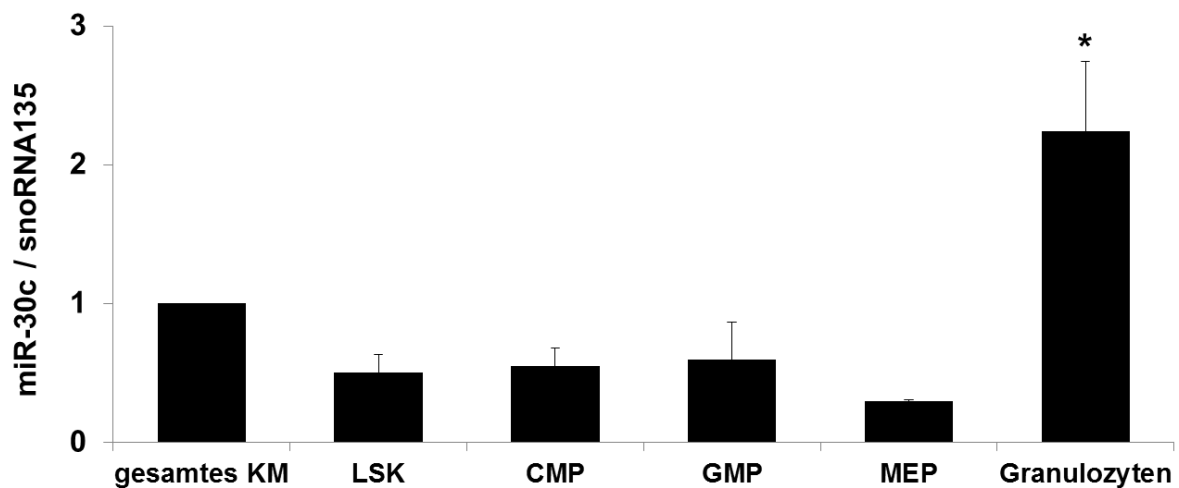


Abbildung 11: Expression der miR-30c in verschiedenen gesorteten Vorläuferzellen und reifen Granulozyten aus dem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen. Analyse der miR-30c Expression mittels quantitativer Real-Time PCR in sortierten Zellpopulationen des Knochenmarks von C57BL/6 Mäusen. Die Werte wurden normalisiert zur snoRNA135. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung des miR-30c/snoRNA135 Verhältnisses von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3-4 gepoolten Mäusen (* $p \leq 0,05$).

Für diese Analyse wurden die Zellen von verschiedenen gesorteten myeloiden Vorläuferpopulationen sowie reifen Granulozyten aus dem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen hinsichtlich ihrer miR-30c Expression analysiert. Die Zellen des gesamten Knochenmarks wurden als Vergleichsgruppe verwendet. Insgesamt wurden in drei unabhängigen Experimenten die Zellen von jeweils drei – vier Mäusen gepoolt. Bei der Analyse der miR-30c Expression zeigte sich entgegen der Erwartungen in den verschiedenen Vorläuferpopulationen LSK, CMP, GMP und MEP eine Reduktion der miR-30c, während die Expression der miRNA in den reifen Granulozyten signifikant erhöht ist im Vergleich zum gesamten Knochenmark (Abbildung 11).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Expression der miR-30c während der Granulopoese von Mäusen noch durch weitere bisher unbekannte Faktoren reguliert wird.

3.5 Expression der miR-30c in Knochenmarkszellen induzierbarer C/EBP α -Knockout-Mäuse

Mäuse mit einem kompletten Knockout von C/EBP α haben einen selektiven Block in der granulozytären Differenzierung der fetalen Leber und bei neugeborenen Mäusen. Die unreifen myeloiden Zellen sammeln sich in der fetalen Leber und im peripheren Blut an, ähnlich den Beobachtungen bei Menschen mit AML⁴⁸. Diese nicht konditionellen C/EBP α -Knockout-Mäuse sterben perinatal an Hypoglykämie¹⁷³. Um den Einfluss von C/EBP α in adulten Mäusen zu untersuchen, generierten Zhang et al. konditionelle C/EBP α -Knockout-Mäuse (B6.129S6(CBA)-Cebpatm1Dgt/J) (Abbildung 12A)⁴⁶. Diese Mäuse zeigen, dass eine Störung des *CEBPA* Gens zu einem selektiven Block der granulozytären Entwicklung führt, indem der Übergang von CMPs zu GMPs geblockt wird und so zu einer Akkumulation von mehr als 30% Blasten im adulten Knochenmark, ähnlich wie bei der humanen AML, führt. Diese Mäuse zeigen keine Ansammlung von unreifen myeloiden Zellen im peripheren Blut, aber der Anteil an unreifen Myeloblasten im Knochenmark ist um 32% erhöht, was ein diagnostisches Kriterium der humanen AML ist⁴⁶. Da also der konditionelle Knockout von C/EBP α zu einem selektiven Block in der Granulopoese führt und keine reifen myeloiden Zellen gebildet werden können, stellte sich die Frage, ob dieser Block auch zu einer verminderten Expression der C/EBP α -induzierten miR-30c führt.

Dazu wurden in 3 unabhängigen Experimenten jeweils 5 adulte C/EBP α ^{flox/flox} \times Mx-Cre konditional-gendefiziente Mäuse⁴⁶ mit Poly I:C behandelt, um einen Mx-Cre Rekombinase vermittelten Knockout von C/EBP α in den myeloiden Zellen zu induzieren. Zwei Wochen nach der letzten Injektion wurden die Zellen des gesamten Knochenmarks isoliert und analysiert, da zu diesem Zeitpunkt mindestens 85% des geflochten Gens nicht mehr in den Knochenmarkszellen vorliegen soll¹⁵⁵. Sowohl Zhang et al. wie auch in dieser Arbeit konnten eine mehr als 95%ige Deletion von C/EBP α im gesamten Knochenmark zeigen (Abbildung 12A)⁴⁶. Der Mx-Cre induzierte Knockout von C/EBP α resultiert in einer hoch signifikanten 34%igen Reduktion des miR-30c Expressionslevel in den Knochenmarkszellen der C/EBP α ^{Δ/Δ} -Mäusen (Abbildung 12B) im Vergleich zu den C/EBP α ^{fl/fl}-Mäusen.

Zusammenfassend zeigt sich, dass *in vivo* ein selektiver Block des Transkriptionsfaktors C/EBP α in der granulozytären Differenzierung zu einer Reduzierung des Expressionslevels der miR-30c in den Knochenmarkszellen führt. Aber auch hier zeigt sich, dass die miR-30c vermutlich durch weitere Faktoren beeinflusst wird.

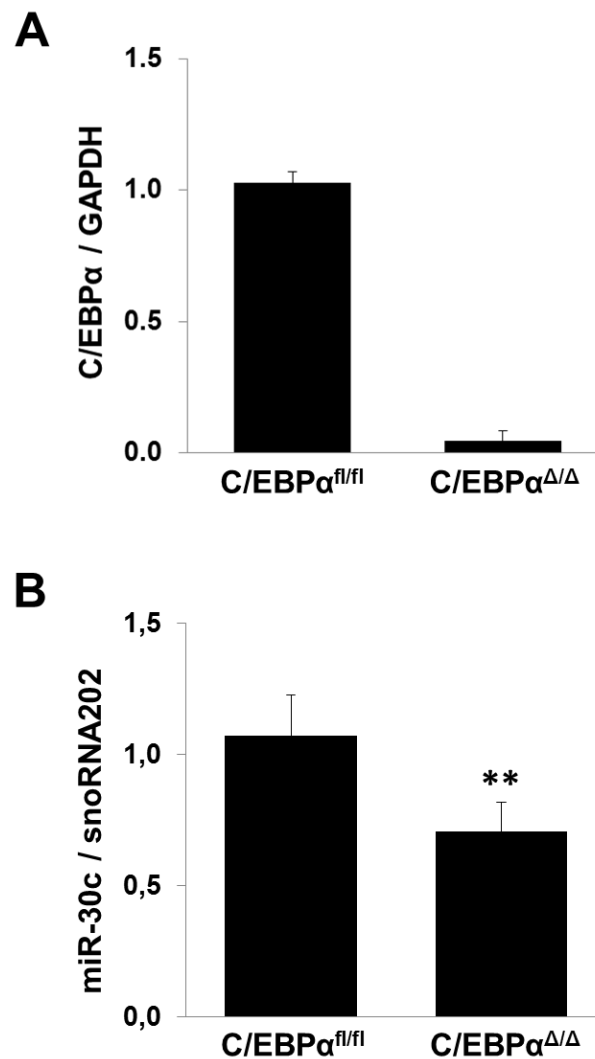


Abbildung 12: Reduzierte Expression der miR-30c in Knochenmarkszellen von induzierbaren C/EBP α -Knockout-Mäusen. (A) und (B) quantitative Real-Time PCR für C/EBP α (A) und miR-30c (B) in Knochenmarkszellen von Poly(I:C) injizierten C/EBP $\alpha^{fl/fl};Mx-Cre$ (C/EBP $\alpha^{\Delta/\Delta}$) Mäusen sowie C/EBP $\alpha^{fl/fl}$ Mäusen als Kontrolle. Die Werte wurden normalisiert zu GAPDH (A) bzw. snoRNA202 (B) und anschließend zum Expressionslevel der C/EBP $\alpha^{fl/fl}$ Mäuse. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung des C/EBP α /GAPDH (A) bzw. miR-30c/snoRNA202 (B) Verhältnisses von fünf unabhängigen Mäusen (** $p \leq 0,005$).

3.6 miR-30c ist ein direktes Ziel von C/EBP α

Alle bisher gezeigten Daten weisen darauf hin, dass die microRNA-30c direkt durch C/EBP α -p42 reguliert wird. Mit Hilfe der bioinformatischen Programme TF-Search “*Transcription Factor Search*” (www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html) und Alibaba2.1 (www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html) wurde der Minimalpromotorbereich von 2000 bp der *MIR30C*-Gene (microRNA-30c-1 und microRNA-30c-2) auf putative C/EBP α -Bindestellen untersucht. Dabei konnten insgesamt vier Bindestellen (#1 –#4) für C/EBP α im direkten 5'-upstream-Bereich der *MIR30C1*, dessen *hostgene NFYC* und der *MIR30C2* identifiziert werden (Abbildung 13).

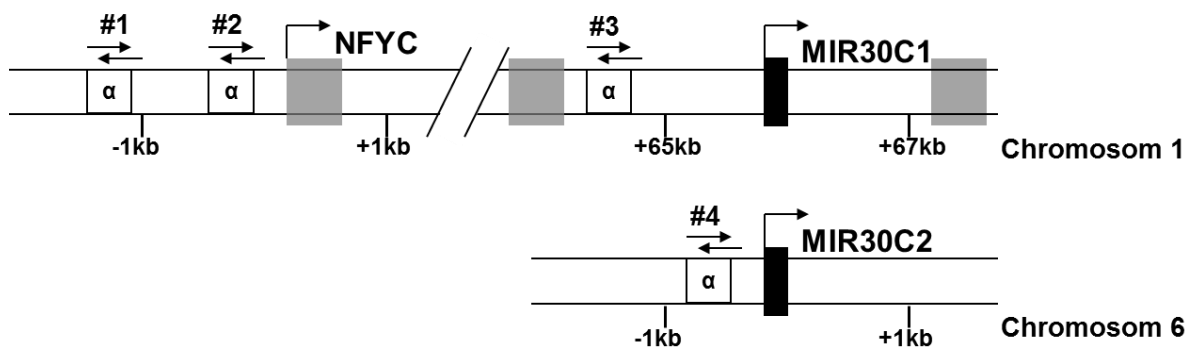


Abbildung 13: Potentielle C/EBP α -Bindestellen im Minimalpromotorbereich der MICRORNA-30c-Gene. Schematische Darstellung möglicher C/EBP α -Bindestellen (α) im direkten 5'-upstream-Bereich der *MIR30C1*, dem *hostgene NFYC* und der *MIR30C2* (Primer #1 - #4).

Um zu zeigen, ob C/EBP α an diesen Stellen in den Promotorbereichen der miR-30c bindet, wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) in K562-C/EBP α -p42ER-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden für vier Stunden mit β -Estradiol behandelt, und die Chromatin-Fragmente mit einem Anti-C/EBP α -Antikörper immunopräzipitiert. Die DNA-Fragmente wurden mit spezifischen Primern für die identifizierten Regionen der miR-30c regulierenden Region analysiert. Das C/EBP α an die entsprechenden DNA-Abschnitte der zwei Promotorbereiche bindet konnte sowohl per semiquantitativer PCR (Abbildung 14A) als auch per quantitativer Real-Time PCR (Abbildung 14B) in zwei unabhängigen Experimenten

nachgewiesen werden. Es zeigte sich zum einen eine Anreicherung der DNA-Abschnitte von allen putativen C/EBP α Bindestellen (Abbildung 14A) sowie eine Änderung in der Bindungsaffinität des Chromatins (Abbildung 14B).

Diese Ergebnisse bekräftigen die Annahme, dass die microRNA-30c ein direktes Ziel des Transkriptionsfaktors C/EBP α ist.

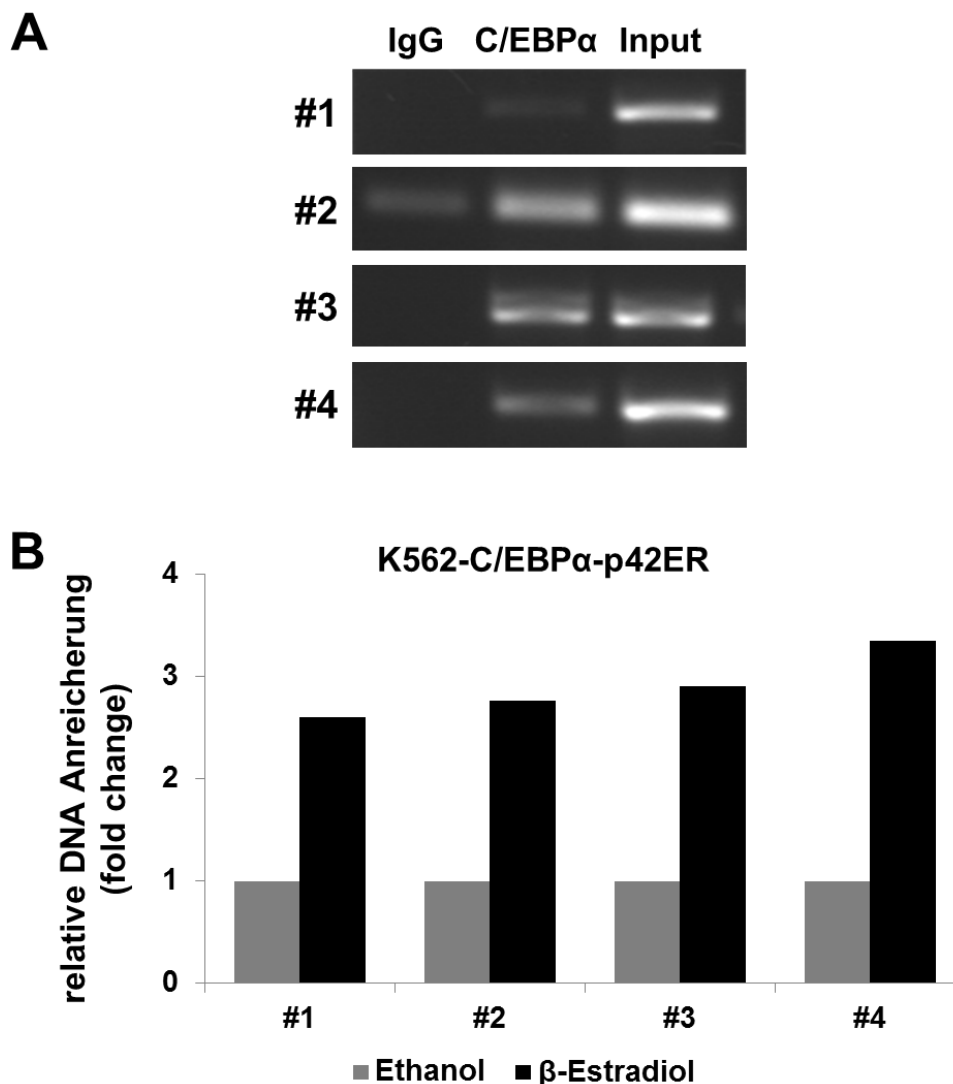


Abbildung 14: miR-30c ist ein direktes Ziel von C/EBP α . (A) Immunpräzipitation des Chromatins von K562-C/EBP α -p42-ER Zellen induziert mit β -Estradiol für 4 Stunden mit anti-C/EBP α bzw. Immunoglobulin G (IgG) Antikörpern. Die gewonnene DNA wurde mittels PCR mit verschiedenen spezifischen Primern für die C/EBP α -Bindung amplifiziert (Primer #1 - #4). Dargestellt ist ein repräsentatives Gel aus 2 unabhängigen Experimenten. (B) Quantitative Real-Time PCR mit den Primern für die angegebenen Regionen mit den Proben von (A). Dargestellt sind die Änderungen des Verhältnisses in der Bindungsaffinität des anti-C/EBP α Antikörpers normalisiert zu IgG der mit β -Estradiol (aktives C/EBP α) behandelten Zellen im Vergleich zu den mit Ethanol behandelten Zellen. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert von zwei unabhängigen Experimenten.

3.7 Notch1 mRNA ist ein direktes Ziel der miR-30c

MiRNAs beeinflussen ihre Ziele auf posttranskriptioneller Ebene indem sie meist die Transkriptionslevel erhalten, aber die Proteintranslation inhibieren. Dieser inhibitorische Effekt führt somit zu einer reduzierten Expression des Ziels auf Proteinebene, während das mRNA-Expressionslevel unbeeinträchtigt bleibt. Allerdings können miRNAs auch beides initiieren, die translationale Inhibition sowie die Degradierung der mRNA ¹²¹.

2003 entwickelte die Gruppe um Prof. Burge den bioinformatischen Algorithmus TargetScan (<http://targetscan.org>), welches potentielle miRNA-mRNA Interaktionen voraussagt ¹²⁰. Dieser Algorithmus ist ein Scoring-System, welches auf der Sequenzkomplementarität, Berechnung der freien Energie bei der Bildung des RNA-Duplex und der phylogenetischen Konservierung zwischen den Vertebraten basiert.

TargetScanHuman 6.0 (<http://targetscan.org>) listet für die Familie miR-30 1375 putative Ziele mit 1578 hoch konservierten und 358 gering konservierten Bindestellen auf. Unter diesen putativen Zielen befindet sich *NOTCH1*, welches eine potentielle Bindestelle der miR-30c in der 3'UTR trägt. Diese putative Bindestelle ist in 20 verschiedenen Spezies, wie z.B. Mensch, Maus, Ratte und Hund, hochkonserviert (Abbildung 15). Die miR-30c hat den höchsten Score und die höchste Sequenzkomplementarität außerhalb der Hauptbinderegion von allen Mitgliedern der miR-30-Familie mit Notch1, und ist somit die repräsentative miRNA der Familie am potentiellen Ziel Notch1. Aufgrund dessen wurde die Hypothese aufgestellt, dass Notch1 ein direktes Hauptziel der miR-30c ist.

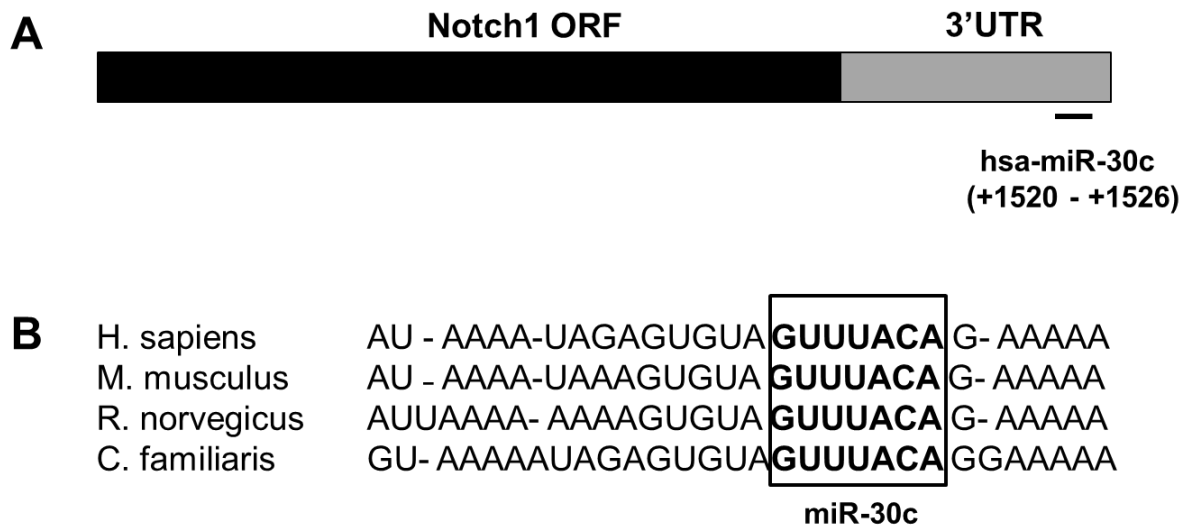


Abbildung 15: Potentielle Bindestelle der miR-30c in der 3'UTR von *NOTCH1* (A) Schematische Repräsentation der miR-30c Bindestelle in der humanen *NOTCH1* 3'UTR. Die Zahlen (+1520 - +1526) stellen die Nukleotide relative zum Terminationscodon des humanen Notch1 dar. **(B)** Konservierung der Bindestelle der miR-30c in der *NOTCH1* 3'UTR von Mensch, Maus, Ratte und Hund.

3.7.1 Inverse Korrelation von miR-30c Expression und des Notch1-Proteinlevels während der Granulopoese

Da in dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte, dass die miR-30c direkt durch C/EBP α -p42 reguliert wird (Abbildung 7A), wurde zunächst der Einfluss von C/EBP α auf die Veränderung des Protein- und mRNA-Levels von Notch1 untersucht. Hierfür wurde das schon anfangs beschriebene *in vitro* Modell der Zelllinien K562-C/EBP α -p42-ER und K562-C/EBP α -p30-ER verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass eine Induktion von C/EBP α mittels β -Estradiol und folglich die Expressionssteigerung der miR-30c in den K562-C/EBP α -p42-ER Zellen zu einer 40 - 50%igen Reduktion des Proteinlevels von Notch1 nach 2- und 6-stündiger Behandlung führt (Abbildung 16A). Das mRNA-Expressionslevel blieb dagegen unbeeinträchtigt (Abbildung 16B). Man sieht somit eine inverse Korrelation zwischen dem Notch1 Proteinlevel (Abbildung 16A) und der miR-30c Expression (Abbildung 7A). Die Zelllinie K562-C/EBP α -p30-ER diente als Kontrolle, da in diesen Zellen die miR-30c nach Behandlung mit β -Estradiol nicht reguliert wird (Abbildung 7B). In diesen Zellen zeigte sich keine Änderung des Protein- sowie mRNA-Expressionslevels von Notch1 (Abbildung 16C+D).

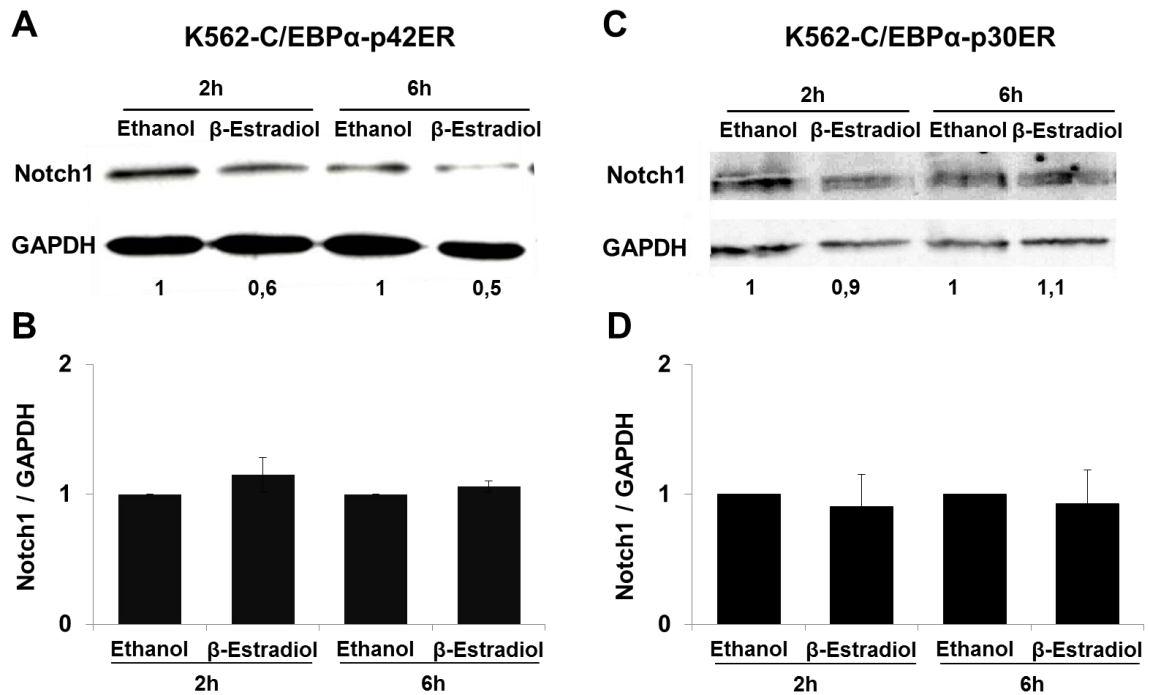


Abbildung 16: Reduktion des Notch1 Proteins durch C/EBP α -p42. Die Zelllinien **(A+B)** K562-C/EBP α -p42ER und **(C+D)** K562-C/EBP α -p30ER wurden mit β -Estradiol (5 μ M) für 2 und 6 Stunden behandelt. **(A+C)** Das gesamte Protein wurde mittels Western Blot und einem für Notch1-spezifischen Antikörper analysiert. GAPDH wurde als Ladungskontrolle verwendet. Die Banden wurden densitometrisch gescannt und anschließend die Werte zu GAPDH normalisiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Gel aus 3 unabhängigen Experimenten. **(B+D)** Die gesamte RNA wurde nach der Isolation mittels quantitativer Real-Time PCR mit spezifischen Primern für Notch1 analysiert. Die Werte wurden zu GAPDH normalisiert. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung des Notch1/GAPDH Verhältnisses von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Isoform C/EBP α -p42 eine vermittelnde Rolle bei der posttranskriptionellen Inhibierung von Notch1 spielt, während dies bei C/EBP α -p30 nicht beobachtet werden konnte. Da sich nur das Proteinlevel und nicht die mRNA-Expression während der Differenzierung ändert, ist dies ein erster Hinweis darauf, dass nicht nur C/EBP α -p42 sondern auch eine miRNA in die posttranskriptionelle Regulation von Notch1 involviert ist.

Da sich bei der G-CSF-induzierten granulozytären Differenzierung von primären humanen CD34+ Vorläuferzellen ebenfalls eine hohe Expression der miR-30c zeigte (Abbildung 8B), wurde in einem Experiment das Proteinlevel von Notch1 analysiert. Sieben Tage nach Beginn der Behandlung der Zellen mit G-CSF konn-

te im Vergleich zur Kontrolle eine Reduzierung des Proteinlevels um 60% beobachtet werden, nach 14 Tagen zeigte sich dann eine vollständiger Block von Notch1 auf Proteinebene (Abbildung 17). Zur Kontrolle wurden CD34+ Zellen mit dem G-CSF-Lösungsmittel Wasser behandelt. Dies ist ein erster Hinweis, dass Notch1 auch während der G-CSF-induzierten Granulopoese von primären humanen CD34+ Vorläuferzellen reduziert wird.

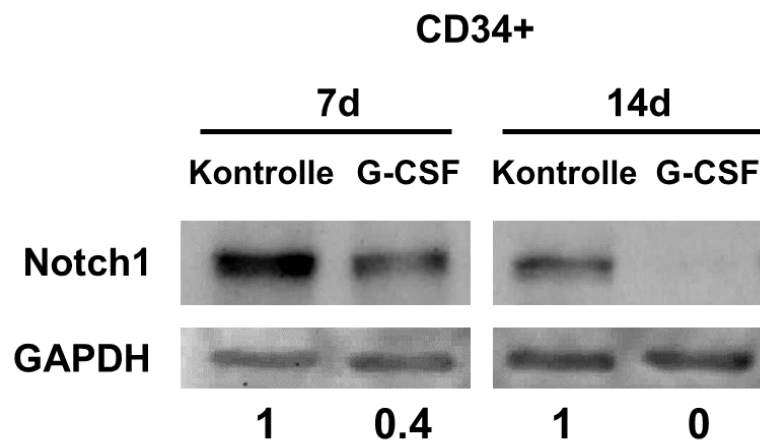


Abbildung 17: Reduktion des Notch1 Proteins während der G-CSF-induzierten Granulozytendifferenzierung. Primäre humane CD34+ Vorläuferzellen wurden alle 3 Tage mit G-CSF behandelt und das Proteinlevel von Notch1 nach 7 und 14 Tagen mittels Western Blot und einem für Notch1-spezifischen Antikörper analysiert. Die Banden wurden densitometrisch gescannt und anschließend die Werte zu GAPDH normalisiert. Die Werte unter den Banden zeigen das Notch1-Proteinlevel.

3.7.2 Reduktion des Notch1-Proteinlevels nach Überexpression der miR-30c

Da die Reduktion des Notch1 Proteinlevels durch die Aktivierung von C/EBP α durch β -Estradiol in K562-C/EBP α -p42ER Zellen (Abbildung 16A) sowie die G-CSF-induzierte granulozytäre Differenzierung von primären humanen CD34+ Vorläuferzellen (Abbildung 17) nur ein indirekter Nachweis für die miR-30c vermittelte Inhibierung von Notch1 ist, wurden auch die Folgen einer direkten Überexpression der miR-30c untersucht.

Mittels transientscher Elektroporation wurden Zellen der Zelllinie K562 zum einen mit einem miR-30c exprimierenden Vektor (pcDNA6.2-EmGFP-miR-30c) und zum

anderen in Kontrollvektor, welcher eine unspezifische Sequenz enthält (pcDNA6.2-EmGFP), transfiziert. Nach 48 Stunden zeigte sich, wie schon bei der C/EBP α -Induktion (Abbildung 16), eine 40%ige Reduktion des Notch1 Proteinlevels (Abbildung 18). Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis darauf, dass Notch1 durch die miR-30c reguliert wird, und somit vermutlich ein direktes Ziel der miRNA ist.

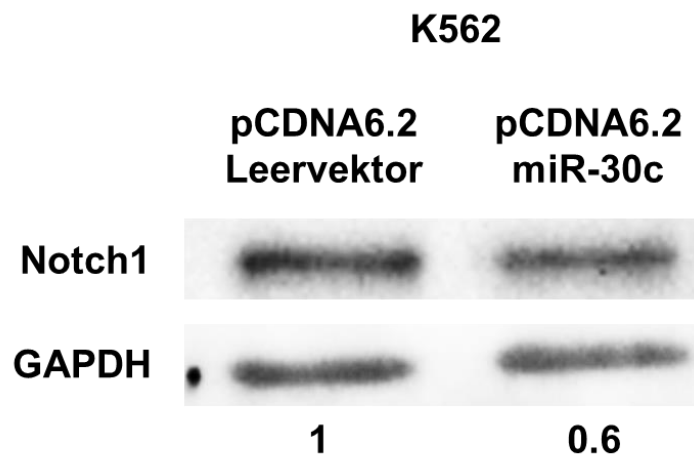


Abbildung 18: Reduktion des Notch1 Proteins durch Überexpression der miR-30c. Für die Überexpression der miR-30c wurden K562 Zellen entweder mit Kontrollvektor oder der pCDNA6.2-emGFP-miR-30c transfiziert und für 48 Stunden kultiviert. Das gesamte Protein wurde mittels Western Blot und einem für Notch1-spezifischen Antikörper analysiert. GAPDH wurde als Ladungskontrolle verwendet. Die Banden wurden densitometrisch gescannt und anschließend die Werte zu GAPDH normalisiert. Die Werte unter den Banden zeigen das Notch1-Proteinlevel. Dargestellt ist ein repräsentatives Gel von zwei Experimenten.

3.7.3 Reduktion des Trib2 Proteins durch C/EBP α -p42

Verschiedene Arbeiten konnten bereits zeigen, dass Trib2 ein transkriptionelles Zielgen von Notch1 ist¹⁰¹, welches wiederum direkt die Funktion von C/EBP α -p42 inhibiert und so eine AML bei Mäusen auslöst⁹⁹⁻¹⁰⁰.

Aufgrund dessen wurde das Proteinlevel von Trib2 nach Induktion von C/EBP α in den K562-C/EBP α -p42ER Zellen zusätzlich in einem Ansatz gemessen. Zur Kontrolle wurden K562-C/EBP α -p42ER Zellen mit dem Lösungsmittel Ethanol behandelt. 2 Stunden nach Behandlung der Zellen mit β -Estradiol konnte noch keine Änderung im Proteinlevel festgestellt werden. Erst nach einer 6-stündigen Be-

handlung der Zellen zeigte sich eine 40%ige Reduktion des Trib2-Proteinlevels (Abbildung 19). Die Inhibierung des Trib2-Proteins findet zeitlich versetzt zur Reduktion des Notch1 Proteins statt (Abbildung 16A), was ein weiterer Hinweis dafür ist, dass Trib2 ein transkriptionelles Zielgen von Notch1 ist. Dieses Ergebnis zeigt hinweislich, dass C/EBP α nicht nur durch Trib2 degradiert wird⁹⁹⁻¹⁰⁰, sondern vermutlich selbst eine vermittelnde Rolle bei dessen Regulation spielt.

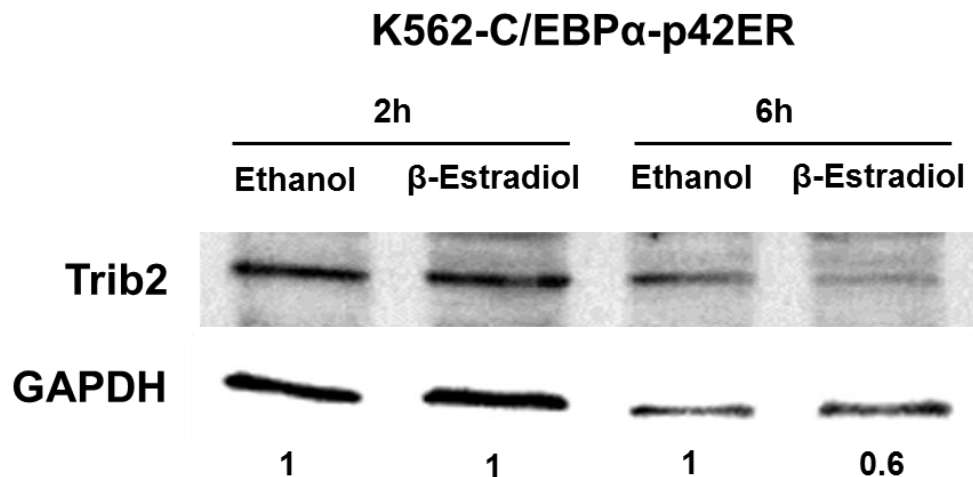


Abbildung 19: Reduktion von Trib2 durch C/EBP α -p42. K562-C/EBP α -p42ER wurden für 2 und 6 Stunden mit β -Estradiol (5 μ M) bzw. Ethanol behandelt. Das gesamte Protein wurde mittels Western Blot und einem für Trib2-spezifischen Antikörper analysiert. GAPDH wurde als Ladungskontrolle verwendet. Die Banden wurden densitometrisch gescannt und anschließend die Werte zu GAPDH normalisiert. Die Werte unter den Banden zeigen das Trib2-Proteinlevel.

3.7.4 Verifikation von Notch1 als direktes Ziel der miR-30c

Um Notch1 als ein direktes Ziel der miR-30c zu verifizieren, wurde ein modifizierter Luziferase-Reporter-Assay durchgeführt. Dies ist eine klassische Methode zur Identifizierung von direkten miRNA-Zielen, bei der ein Luziferase-Reporter-konstrukt verwendet wird.

In dieser Arbeit wurde die komplette 3'UTR der *NOTCH1* mRNA mit der potentiellen Bindesequenz der miR-30c hinter die Luziferasegen-codierende Region des Vektors pGL3-control kloniert (pGL3-NOTCH1-3'UTR-WT, Abbildung 20). Außerdem wurde ein zweites Konstrukt mit 7 Punktmutationen in der Bindesequenz der

miR-30c kloniert, welches als Kontrolle für die Spezifität der miR-30c vermittelten Inhibierung dient (pGL3-NOTCH1-3'UTR-mut, Abbildung 20).

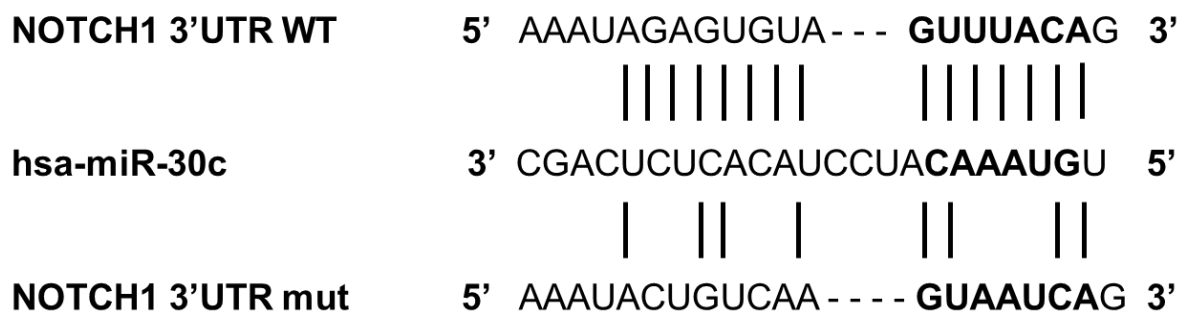


Abbildung 20: Potentielle sowie mutierte Bindestelle der miR-30c in der 3'UTR von NOTCH1. Schematische Präsentation der vorhergesagten sowie mutierten Bindestelle der miR-30c in der 3'UTR von *NOTCH1* in den entsprechenden Luziferase-Konstrukten, welche für die Luziferase-Reporter-Assays verwendet wurden.

Diese zwei verschiedenen Luziferase-Reporterkonstrukte wurden jeweils zusammen mit einem miR-30c Überexpressionsvektor (pCDNA6.2-emGFP-miR-30c) bzw. Kontrollvektor (pCDNA6.2-emGFP-miR), sowie einem Renilla-Luziferase-Reportervektor (pRL0) in Zellen der Zelllinie MV4;11, welche selbst keine miR-30c exprimieren¹⁵³ ko-transfiziert. Nach 24 Stunden zeigte die miR-30c einen negativen Effekt auf die Luziferaseaktivität des pGL3-NOTCH1-3'UTR-WT Konstruktes. Die Überexpression der miR-30c führte hierbei zu einer hoch signifikanten Reduktion der Luziferaseaktivität um 70% (Abbildung 21, 4. Balken). Bei den Luziferase-Reporter-Assays mit dem mutierten Konstrukt, welches Mutationen in der Bindestelle der miR-30c enthält, konnte im Gegensatz dazu kein Effekt auf die Luziferaseaktivität beobachtet werden (Abbildung 21, 6. Balken). Bei der Transfektion der MV4;11 Zellen mit dem Kontrollvektor, welches nur eine unspezifische miR-Sequenz enthält (pCDNA6.2-emGFP-miR), zeigte sich weder beim Wildtyp-Luziferase-Reporterkonstrukt noch bei der Mutante ein Effekt auf die Luziferaseaktivität (Abbildung 21, 3. und 5. Balken).

Zusammenfassend zeigt sich, dass Notch1 ein direktes Ziel der miR-30c ist und von dieser posttranskriptionell negativ reguliert wird. Die Ergebnisse des Luziferase-Assays zeigen, dass es sich um eine direkte Interaktion zwischen miR-30c mit der 3'UTR von *NOTCH1* und somit um eine miR-30c-spezifische Inhibierung von Notch1 handelt.

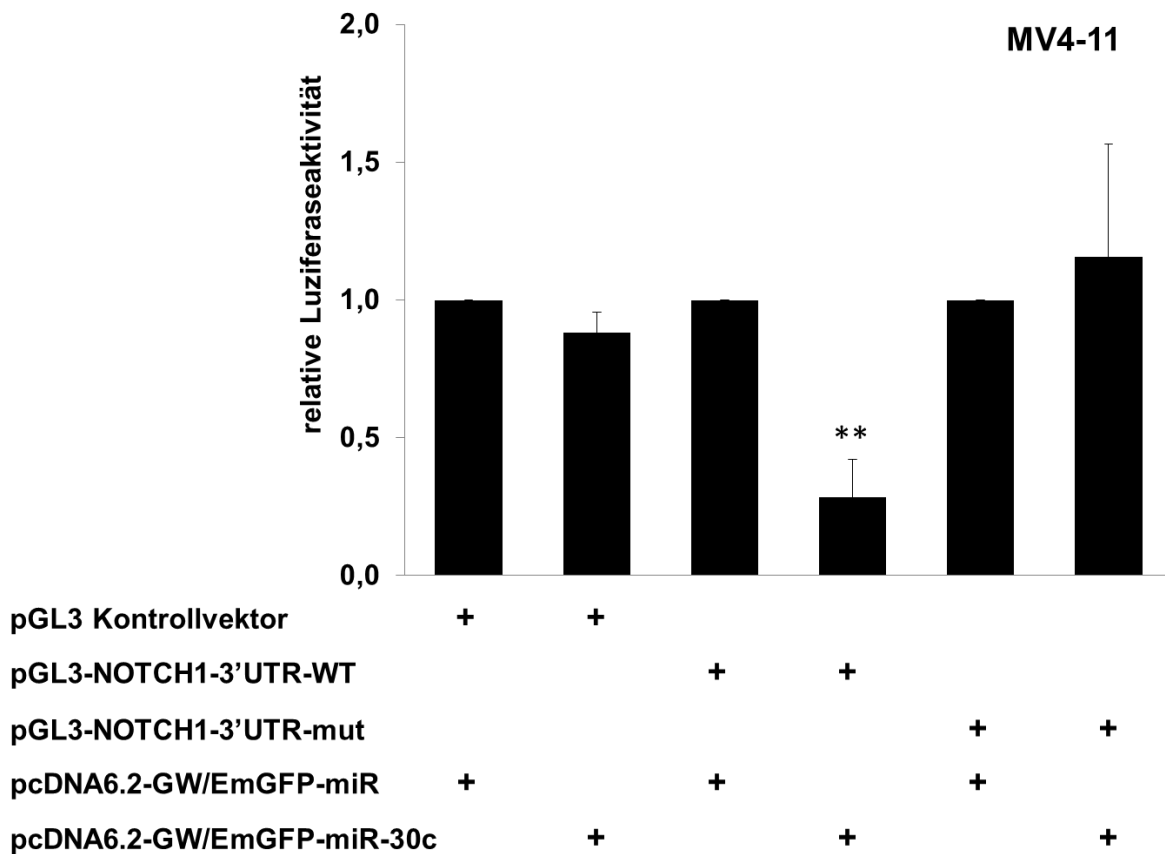


Abbildung 21: Luziferase-Assay. MV4;11 Zellen wurden mit den *NOTCH1* 3'UTR (Wildtyp bzw. Mutante) und dem miR-30c Überexpressionsvektor (pCDNA6.2-GW/emGFP-miR-30c) bzw. mit entsprechenden Kontrollvektoren ko-transfiziert. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung der relativen Luziferaseaktivität von jeweils drei unabhängigen Experimenten (** $p \leq 0.01$).

3.8 Die Rolle der miR-30c für die C/EBP α -vermittelte Notch1-Inhibierung sowie Induktion der myeloide Differenzierung

In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die miR-30c ein direktes Ziel von C/EBP α -p42 ist (Abbildung 14), und die mRNA von *NOTCH1* direkt posttranskriptionell reguliert (Abbildung 18 und Abbildung 21). Zudem wurde Notch1 durch die Aktivierung von C/EBP α -p42 translational negativ beeinflusst (Abbildung 16). Deshalb stellte sich die Frage, ob C/EBP α die Notch1 Proteinexpression nur durch die Aktivierung der miR-30c blockiert. Hierfür wurden in einem Experiment K562 Zellen für 48 Stunden gleichzeitig mit inhibierenden Oligonukleotiden, welche einen spezifischen Block der miR-30c (LNA-miR-30c) herbeiführen, bzw. Kontroll-Oligonukleotiden (scramble) sowie einem C/EBP α -Überexpressionskonstrukt

(pcDNA3.1-C/EBP α) ko-transfiziert. K562 Zellen exprimieren endogen die miR-30c¹⁵³, hier führt eine Reduktion der miRNA zu einem Anstieg des Notch1 Proteinlevels (Abbildung 22, 2. Bande). Bei einer Überexpression von C/EBP α in den Zellen kommt es zu einer fast kompletten Inhibierung des Notch1 Proteins (Abbildung 22, 3. Bande), was auch schon durch die Aktivierung von C/EBP α mittels β -Estradiol in K562-C/EBP α -p42ER gezeigt werden konnte (Abbildung 16). Allerdings hebt ein Block der miR-30c mittels LNAs den C/EBP α -vermittelten Translationsblock von Notch1 wieder auf und es kommt zu einem Anstieg des Notch1 Proteinlevels (Abbildung 22, 4. Bande). Diese Ergebnisse zeigen, dass es scheinbar ohne die Anwesenheit der funktionsfähigen miR-30c nicht zu einer Inhibierung des Notch1 Proteinlevels kommt, was zuvor bei der Induktion von C/EBP α sowie der GCSF-induzierten granulozytären Differenzierung gezeigt werden konnte. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die miR-30c eine wichtige Rolle bei der C/EBP α -vermittelte Inhibierung von Notch1 auf Proteinebene spielt.

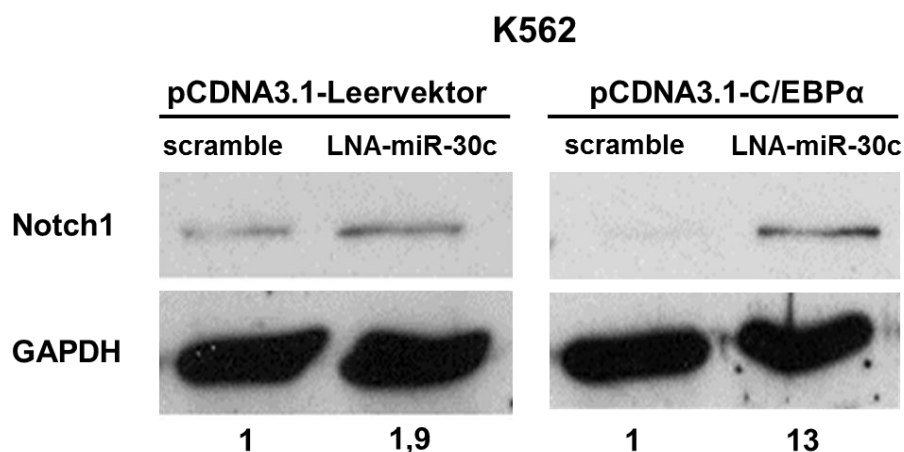


Abbildung 22: miR-30c ist notwendig für C/EBP α um Notch1 zu blocken. K562 Zellen wurden mit pcDNA3-C/EBP α bzw. pCDNA3-Leervektor zusammen mit LNA Oligonukleotiden für die miR-30c bzw. scramble (Kontrolle) für 48 Stunden ko-transfiziert. Das gesamte Protein wurde mittels Western Blot und einem für Notch1-spezifischen Antikörper analysiert. GAPDH wurde als Ladungskontrolle verwendet. Die Banden wurden densitometrisch gescannt und anschließend die Werte zu GAPDH normalisiert. Die Werte unter den Banden zeigen das Notch1-Proteinlevel.

Es konnte zuvor gezeigt werden, dass die miR-30c während der granulozytären Differenzierung von Zelllinien sowie primären humanen Vorläuferzellen hoch exprimiert wird (Abbildung 6 - Abbildung 8), aufgrund dessen stellte sich die Frage,

ob die miRNA auch notwendig ist, um die granulozytäre Differenzierung zu induzieren. Hierfür wurde die myeloide Differenzierung in K562-C/EBP α -p42ER Zellen mittels β -Estradiol induziert, was zu einer Induktion der miR-30c führt (Abbildung 23). Anschließend wurde die miR-30c mit Hilfe von LNA-Oligonukleotiden geblockt. 24 Stunden nach der Inhibierung der miR-30c wurde mittels Durchflusszytometrie die Expression des myeloiden Oberflächenmarker CD11b gemessen. Der Block der miR-30c führte zu einer ca. 30%igen signifikanten Reduktion von CD11b. Durch die Inhibierung der miR-30c wurde die induzierte granulozytäre Differenzierung geblockt.

Zusammenfassend zeigt sich, dass ein Block der miR-30c tendenziell zu einer reduzierten Expression von CD11b führt und somit vermutlich eine wichtige Rolle in der C/EBP α -vermittelten Induktion der myeloiden Differenzierung spielt.

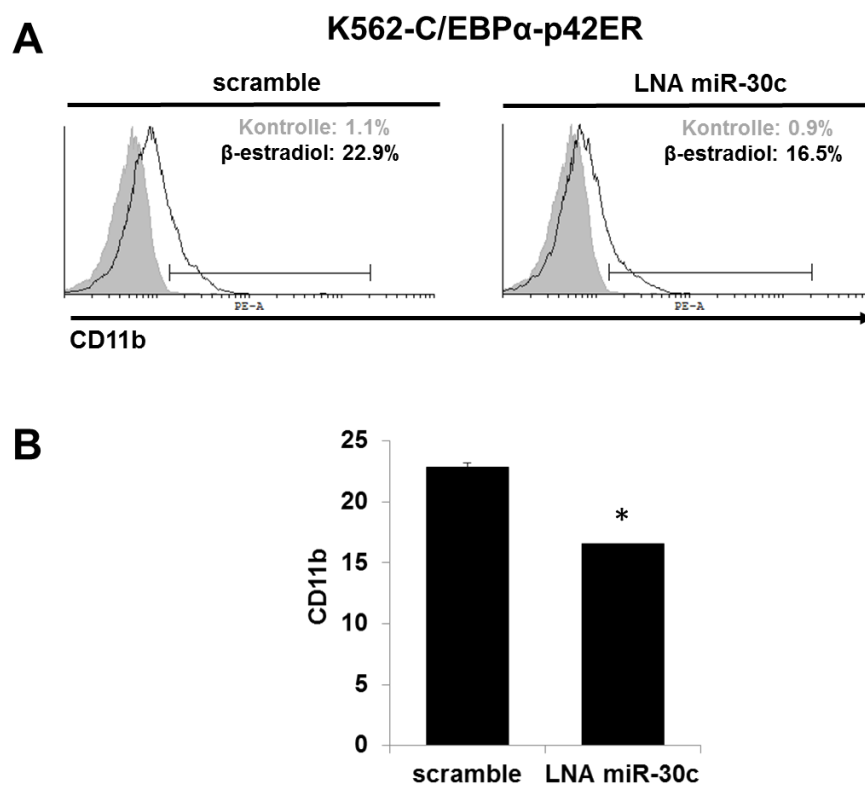


Abbildung 23: miR-30c ist notwendig für C/EBP α um die myeloide Differenzierung zu induzieren. Analyse des myeloiden Oberflächenmarkers CD11b mittels Durchflusszytometrie 24 Stunden nach Block der miR-30c mit LNA Oligonukleotiden in β -Estradiol (5 μ M) behandelten K562-C/EBP α -p42ER Zellen. **A:** Dargestellt ist ein repräsentatives Histogramm aus drei unabhängigen Experimenten. **B:** Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

4 Diskussion

Die Hämatopoese ist ein dynamischer und hoch komplexer Prozess. Die Entwicklung von der pluripotenten Stammzelle bis hin zur ausdifferenzierten, funktionellen Zelle eines bestimmten Zelltyps wird durch das Zusammenwirken verschiedenster Signale in der Zelle gewährleistet. Eine Störung dieser regulatorischen Mechanismen kann zu einem Ungleichgewicht zwischen Differenzierung und Proliferation führen, was folglich zu einer fehlenden Ausreifung bei gleichzeitiger starker Vermehrung der undifferenzierten Vorläuferzellen führen kann. miRNAs, eine neue Klasse von RNA-Molekülen, spielen eine Rolle in der Regulation dieser Mechanismen. Eine Deregulation der miRNAs wird zudem mit der Entstehung von Neoplasien, einschließlich Leukämien, assoziiert ¹⁰⁹⁻¹¹⁰.

Der Transkriptionsfaktor C/EBP α ist einer der Hauptregulatoren der normalen Hämatopoese ⁴³ und in fast der Hälfte aller akuten myeloischen Leukämien durch verschiedenste Mechanismen fehlreguliert ⁵⁶⁻⁵⁸. Einige vorrangegangene Studien konnten bereits zeigen, dass C/EBP α hier auch durch die Regulation von verschiedenen spezifischen miRNAs agiert ¹³⁶⁻¹³⁹. Bisher wurde noch kein *Screening* spezifisch für C/EBP α -induzierte miRNAs in der Granulopoese durchgeführt. Aufgrund dessen wurden in der vorliegenden Dissertation weitere durch C/EBP α -induzierte miRNAs mittels *Microarray* identifiziert. Von den identifizierten C/EBP α -regulierten miRNAs wurde eine, für die Granulopoese bisher noch unbekannte miRNA, funktionell untersucht und charakterisiert.

Für die miR-30c wurde bereits eine hohe Expression in Granulozyten gezeigt ¹⁵³ sowie eine tumorsuppressive Wirkung dieser miRNA in der akuten myeloischen Leukämie mit *NPM1* Mutationen beschrieben ¹⁵². Trotz dessen wurden die Regulation sowie die funktionelle und biologischen Relevanz der miR-30c in der granulozytären Differenzierung bzw. Hämatopoese noch nicht weitergehend untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Untersuchungen zur spezifische Regulation und Funktion der miR-30c in der Granulopoese sowie der akuten myeloischen Leukämie durchgeführt. Aufgrund der Regulation der miR-30c durch C/EBP α bestand hier spezielles Interesse an der Untersuchung der Rolle der miR-30c in der Vermittlung inhibitorischer Effekte von C/EBP α , vor allem bei der Inhibierung differenzierungshemmender Faktoren. Hierbei wurde Notch1, ein Trans-

membranrezeptor und Transkriptionsregulator, welcher die granulozytäre Differenzierung blockt, als ein neues Ziel der miR-30c bestätigt und dessen Regulation durch C/EBP α und die miR-30c untersucht. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse dieser Experimente mit dem aktuellen Stand der Literatur verglichen und diskutiert.

4.1 Identifizierung C/EBP α -regulierter miRNAs mittels *Microarray*

Bei dem in dieser Arbeit verwendet *Microarray* zur Identifizierung C/EBP α -induzierter miRNAs konnten insgesamt 204 exprimierte miRNAs detektiert werden. Von diesen weisen 200 miRNAs ein verändertes Expressionsprofil im Vergleich zur Kontrolle, den nicht C/EBP α -exprimierenden Zellen, auf (Tabelle 4). Durch die exogene Expression von C/EBP α wurden 24 miRNAs induziert und zeigen eine erhöhte bzw. hohe Expression auf. 176 miRNAs wurden herunterreguliert. Zudem zeigen vier miRNAs keinen Unterschied in ihrer Expression durch C/EBP α zum untersuchten Zeitpunkt. Auch die RNA U6 small nuclear 2 (RNU6B = U6) wird nicht durch C/EBP α reguliert. Sie gilt als *housekeeping*-Gen und wurde deshalb bei der Berechnung der quantitativen Real-Time-PCRs zur Normalisierung verwendet.

Einige dieser identifizierten durch C/EBP α -regulierten miRNAs wurden schon für die Hämatopoese sowie Leukämie beschrieben und z.T. funktionell genauer untersucht. Unter den hier als C/EBP α -hochregulierten miRNAs sind mehrere zu finden, die in der Granulopoese bzw. Hämatopoese hoch exprimiert werden und so eine Rolle bei der Differenzierung spielen. Allerdings konnte bisher nur für die miR-223¹³⁶⁻¹³⁸ und das miR-29a/b1-Cluster¹³⁹ eine direkte Regulation durch C/EBP α nachgewiesen werden und somit als direkte Ziele von C/EBP α identifiziert werden. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass in der AML mit dereguliertem C/EBP α die Transaktivierung dieser drei tumorsuppressiven miRNAs inhibiert und die myeloide Differenzierung geblockt ist¹³⁶⁻¹³⁹. In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Induktion von C/EBP α allerdings nur eine Hochregulation der miR-223 gezeigt werden. Die miR-29b zeigte nach C/EBP α -Induktion eine enorme Herunterregulation ihrer Expression. Die miR-34a und miR-29a hingegen konnten auf dem *Microarray* nicht detektiert werden. Der *Microarray* stellte nur ein initiales Experiment dar, um einen Ansatzpunkt für eine mögliche Regulation der identifizier-

ten miRNAs durch C/EBP α zu bekommen. Die Expression verschiedener miRNAs wurde anschließend mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht und mit dem *Microarray* verglichen (Abbildung 5). Hier zeigten, mit Ausnahme der miR-106b und miR-191, alle analysierten miRNAs dieselbe Tendenz der Regulation.

Ebenfalls zeigten zwei weitere für die Granulopoese bekannte miRNAs, miR-15b und miR-16, eine erhöhte Expression durch die Induktion von C/EBP α . Beide werden bei ATRA-induzierter granulozytärer Differenzierung von NB4-Zellen eine hochreguliert ¹⁷⁴⁻¹⁷⁵. Die ebenfalls durch C/EBP α hochregulierte miR-142-3p und 142-5p werden sehr stark in allen hämatopoetischen Geweben exprimiert und zeigen keine bzw. nur eine geringe Expression in nicht hämatopoetischen Geweben ¹²⁵. So zeigt auch die miR-21 eine Hochregulation sowohl auf dem *Microarray* wie auch mittels quantitativer Real-Time PCR. In der Literatur wird die miR-21 allerdings gemeinsam mit der miR-196b als Effektor der Monopoese und Antagonist der Granulopoese beschrieben. Beim Übergang der Zellen vom CMP zum GMP-Stadium, wo C/EBP α hoch exprimiert wird, sind beide miRNAs signifikant reprimiert ¹⁷⁶. Dies lässt vermuten, dass die miR-21 hier von anderen Faktoren reguliert wird, und C/EBP α keinen direkten Einfluss auf die Expression der miR-21 ausübt. Den stärksten Effekt auf die Induktion von C/EBP α zeigte die hochregulierte miR-30c. Diese miRNA wurde bisher noch nicht genauer im hämatopoetischen System untersucht, allerdings konnte bisher gezeigt werden, dass die miR-30c in Granulozyten hoch exprimiert wird ¹⁵³ und in leukämischen Zellen von AML-Patienten eine reduzierte Expression zeigt ¹⁷¹⁻¹⁷². In anderen Krebserkrankungen wie NSCLC ¹⁷⁷, hämophagozytische Lymphohistiozytose ¹⁷⁸, Multiples Myelom ¹⁷⁹, Prostata- ¹⁸⁰ sowie Mamakarzinom ^{149,181} konnte bereits eine geringere bzw. reduzierte Expression der miR-30c nachgewiesen werden. Deshalb wurde die miR-30c bereits als neuer prognostischer Faktor vorgeschlagen ^{177-178,180}. Eine prognostische Relevanz der miR-30c könnte somit auch bei der AML vorliegen, dies müsste aber in weiteren Analysen von AML-Patienten genauer untersucht werden. Zudem konnte für die miR-30c eine tumorsuppressive Wirkung bei Mama- ¹⁴⁹ und Prostatakarzinom ¹⁸⁰ sowie auch bei AML mit *NPM1*-Mutationen ¹⁵² gezeigt werden.

Unter den 170 herunterregulierten miRNAs befinden sich z.B. die miR-424, miR-125b, miR-181a und miR-24, deren Expression sich negative auf den Verlauf der granulozytären Differenzierung auswirkt. So führt eine Überexpression der miR-24

und miR-125 zu einem Block der Granulopoese^{132,182}. Die miR-125b ist in neutrophilen Granulozyten herunterreguliert¹³¹ und eine Überexpression führt zur Entwicklung einer Leukämie¹⁸³. Ebenso ist die miR-181a in Granulozyten sehr gering exprimiert¹⁵³ und konnte in frühen Vorläuferzellen nachgewiesen werden¹²⁵. Choong et al. wiesen eine erhöhte Expression der miR-181a sowie miR-181b während der Erythrozytendifferenzierung nach¹⁸⁴. In AML-Patientenproben mit *CEBPA*-Mutationen weisen alle vier Mitglieder der miR-181-Familie eine hohe Expression auf¹⁸⁵. Su et al. konnten zeigen, dass die miR-181a die granulozytäre sowie makrophagen-ähnliche Differenzierung durch die direkte Herunterregulation von *PRKCD* inhibiert¹⁸⁶. Zudem konnte aber gezeigt werden, dass die miR-181a direkt durch *C/EBPα-p30* hochreguliert wird¹⁸⁷. Bei der miR-424 führt eine ectopische Expression zu einer monozytären Differenzierung von humanen myeloiden Zelllinien und primären humanen CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen¹⁸⁸. Bisher wurde für die detektierten *C/EBPα*-regulierten miRNAs, mit Ausnahme der miR-223, miR-29b^{136,139}, keine direkte Regulation durch *C/EBPα* nachgewiesen. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass z.B. die miR-142 in hämatopoetischen Zellen durch PU.1 reguliert wird¹⁸⁹, und die miR-15 und miR-16 transkriptionelle Zielgene von E2F1 sind¹⁹⁰. Trotz dessen besteht die Möglichkeit, dass die identifizierten miRNAs direkt durch *C/EBPα* reguliert werden und sie somit direkte Zielgene des Transkriptionsfaktors sein können. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es eine neue durch *C/EBPα*-regulierte miRNA zu untersuchen und genauer die Rolle in der granulozytären Differenzierung sowie der akuten myeloiden Leukämie zu charakterisieren. Im Weiteren wird die Rolle der miR-30c während der granulozytären Differenzierung sowie AML genauer betrachtet.

4.2 miR-30c – ein neues Ziel von *C/EBPα* in der Granulopoese

Die zwei meist beschriebenen Hauptformen der *CEBPA*-Mutationen, liegen in der N- und C-terminalen Domäne. Dies bestätigt vor allem die Relevanz dieser *C/EBPα*-Domänen für die Leukämogenese. Beide Mutationen führen zum Verlust der Funktion im *C/EBPα*-Protein, da die resultierenden Mutanten keine Granulopoese veranlassen, die myeloide Zellproliferation nicht hemmen¹⁵⁶ und so zu einer AML führen¹⁹¹. Die N-terminale Frame-shift-Mutation von *C/EBPα* ist für den

verfrühten Abbruch bei der Translation der vollen C/EBP α -p42 Isoform verantwortlich, während dabei das gekürzte C/EBP α -p30 Protein intakt bleibt ⁵⁶.

Zur Untersuchung der spezifisch durch C/EBP α vermittelten Transaktivierung der miR-30c sowie zur Bestimmung der Effekte der zwei verschiedenen Isoformen wurde in der vorliegenden Arbeit das Modell einer C/EBP α induzierbaren Zelllinie verwendet. Die Zelllinie K562-C/EBP α -ER ist stabil mit einem Estrogen-induzierbaren C/EBP α -(sowohl p42 als auch p30)-Estrogenrezeptorfusionsprotein transfiziert ¹⁵⁶. Die gezielte Induktion von C/EBP α -p42 führt dabei zu einem stetigen Anstieg der miR-30c Expression in der frühen granulozytären Differenzierung (Abbildung 7A). Die verkürzte Form C/EBP α -p30 ist hingegen nicht in der Lage die Expression der miR-30c zu induzieren bzw. zu regulieren (Abbildung 7B). Dies zeigt, dass die miR-30c nur durch die C/EBP α -Isoform p42 reguliert wird. Ebenso zeigte die ATRA- bzw. G-CSF-induzierte granulozytäre Differenzierung der Zelllinie U937 sowie der primären humanen CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen (Abbildung 8), dass dieser Effekt nicht zelllinienspezifisch ist. Auch bei der granulozytären Differenzierung primärer Vorläuferzellen zeigte sich ein Anstieg der miR-30c Expression in den frühen Zeitpunkten. Dies lässt vermuten, dass die miR-30c besonders zu Beginn der granulozytären Differenzierung eine wesentliche Rolle spielt.

Der Transkriptionsfaktor C/EBP α spielt eine wichtige Rolle beim Übergang der myeloiden Zellen vom CMP- zum GMP-Stadium und wird anschließend nicht mehr benötigt ⁴⁶, ist aber in den reifen Granulozyten noch exprimiert ⁴⁵. Angesichts dessen wurde eine erhöhte Expression der miR-30c vor allem in den myeloiden Vorläuferpopulationen CMP und GMP erwartet. Bei *in vivo* Untersuchungen der gesamten Knochenmarkszellen von C57BL/6 Mäusen zeigte sich entgegen der anfänglichen Erwartungen nur in den Granulozyten eine erhöhte miR-30c Expression und nicht in den myeloiden Vorläuferpopulationen (Abbildung 11). Aufgrund dessen, dass sich bei den *in vitro* Experimenten eine Hochregulation von C/EBP α und der miR-30c vor allem in der frühen Granulopoese zeigte (Abbildung 7A und Abbildung 8), spielen bei der Regulation der miR-30c während der granulozytären Differenzierung bei Mäusen vermutlich weitere bisher unbekannte Faktoren eine Rolle.

Ein für die Hämatopoese spezifischer *Knockout* von *C/EBP α* in erwachsenen Mäusen führt zu einem selektiven Block der granulozytäre Entwicklung und somit zu einem Arrest der myeloiden Zellen im CMP-Stadium⁴⁶. Aufgrund dieses spezifischen *Knockouts* von *C/EBP α* kommt es zu einer signifikanten Herunterregulation der *miR-30c* im gesamten Knochenmark im Vergleich zu den Kontrollmäusen, welche keine Störung des *CEBPA*-Gens aufweisen (Abbildung 12B).

Bei der Untersuchung der Minimalpromotorbereiche der zwei *MIR30C*-Gene (*miRNA-30c-1* und *miRNA-30c-2*) konnten insgesamt vier mögliche Bindestellen für *C/EBP α* im direkten 5'-upstream-Bereich der *MIR30C1*, dessen *hostgene NFYC* und der *MIR30C2* identifiziert werden (Abbildung 13). Mittels Chromatin Immunopräzipitation konnte die Bindung von *C/EBP α* an diese spezifischen DNA-Abschnitte gezeigt werden (Abbildung 14). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Expression der *miR-30c* einer durch den Transkriptionsfaktor *C/EBP α* vermittelten Regulation unterliegt. *C/EBP α* induziert während der granulozytären Differenzierung direkt die *miR-30c*.

4.3 Notch1 – neues Ziel der *miR-30c*

Nachdem bereits die direkte Regulation der *miR-30c* durch den Transkriptionsfaktor *C/EBP α* mit Hilfe einer *C/EBP α* induzierbaren Zelllinie und Chromatin Immunopräzipitation experimentell bestätigt werden konnte, lag das weitere Augenmerk auf der Identifizierung eines neuen und vor allem biologisch relevanten Ziels. Aufgrund der regulatorischen Funktionsweise von *miRNAs*, sind im Falle der *miR-30c* wichtige Ziele, deren Unterdrückung während der Granulozyten-differenzierung essentiell ist und gewährleistet sein muss, um einen geregelten Ablauf sicher zu stellen. Als ein neues direktes Ziel der *miR-30c* in der Granulopoese konnte dabei der Membranrezeptor und Transkriptionsregulator *Notch1* nachgewiesen werden. Es ist bereits bekannt, dass *Notch1* im hämatopoetischen System die Selbsterneuerung von Stammzellen gegenüber der Differenzierung favorisiert, des Weiteren begünstigt *Notch1* auf früher Ebene die lymphoide gegenüber der myeloiden Differenzierung⁸⁴. Bei der Differenzierung von dendritischen Zellen konnte bereits eine direkte Regulation von *Notch1* durch das Familienmitglied *miR-30b* gezeigt werden¹⁹². Des Weiteren zeigte sich bei der fokal segmentalen Glomerulosklero-

se (FSGS), das alle Mitglieder der miR-30-Familie eine protektive Rolle durch die direkte Inhibierung von Notch1 und p53, welche Podozytenschädigung vermitteln, ausüben¹⁹³.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Induktion der miR-30c mittels der verwendeten C/EBP α -p42 induzierbaren Zelllinie eine Reduktion des Notch1 Proteinlevels bei gleichzeitig unbeeinträchtigtter mRNA-Expression während der granulozytären Differenzierung gezeigt werden (Abbildung 16A und Abbildung 16B). Zudem zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen der miR-30c Expression (Abbildung 7) und dem Notch1 Proteinlevel (Abbildung 16A). Bei der Induktion der C/EBP α -p30 Zelllinie wiederum konnte keine Regulation des Proteinlevels und der mRNA-Expression beobachtet werden (Abbildung 16C und Abbildung 16D). Die Reduktion des Proteinlevels bei gleichzeitig unbeeinträchtigtter mRNA-Expression ist ein typisches Merkmal einer miRNA regulierten Genexpression und war jahrelang der vermutete *modus operandi* von Säuger-miRNAs. Mittlerweile gibt es immer mehr Studien, die zeigen, dass miRNAs auch die Transkriptionslevels durch Deadenylierung, Degradation und Destabilisierung der Ziel-mRNAs beeinflussen können¹⁹⁴⁻¹⁹⁵. Eine Reduktion des Notch1 Proteinlevels konnte zudem durch die direkte transiente Überexpression der miR-30c (Abbildung 18) sowie während der granulozytären Differenzierung von humanen primären hämatopoetischen CD34+ Vorläuferzellen (Abbildung 17) gezeigt werden. Die Korrelation der Ergebnisse der verschiedenen Experimente zeigt, dass es sich nicht um einen zelllinienspezifischen Effekt handelt, aber auch, dass die negative Regulation von Notch1 nicht durch eine andere C/EBP α -regulierte miRNA vermittelt wird. Allerdings ist eine mögliche Beteiligung weiterer bisher nicht identifizierter miRNAs nicht auszuschließen, da Notch1 in verschiedenen weiteren Organ- und Zellsystemen durch andere miRNAs reguliert wird. Im humanen Nasen-Rachen-Karzinom wird Notch1 durch die miR-200 reguliert¹⁹⁶. Mit der neuronalen miR-326 bildet Notch1 einen *feedback loop*¹⁵⁴.

In weiteren Experimenten mit zeitgleicher Überexpression von C/EBP α und der Blockierung der miR-30c durch LNAs konnte nachgewiesen werden, dass die miR-30c bei der Inhibierung von Notch1 Anteile C/EBP α vermittelter Funktionen übernimmt (Abbildung 22). Bei der Inhibierung der miR-30c konnte, trotz der Anwesenheit von C/EBP α , ein Translationsblock von Notch1 nicht mehr beobachtet

werden, was zu einem Anstieg von Notch1 auf Proteinebene führt (Abbildung 22). Zudem zeigte sich beim Block der miR-30c in der Zelllinie K562, welche kein C/EBP α , aber die miR-30c exprimiert, eine erhöhte Translation von Notch1 (Abbildung 22). Ohne die Expression der funktionsfähigen miR-30c kommt es somit nicht zu einer Hemmung des Proteins Notch1. Es zeigt sich, dass die miR-30c notwendig für C/EBP α ist, um Notch1 auf Proteinebene zu inhibieren.

Die Expression von Notch1 führt zu einer Inhibierung der granulozytären Differenzierung und somit zum Erhalt eines unreifen Phänotyps in myeloiden Zelllinien sowie primären Vorläuferzellen^{73,85-87}. Ein direktes transkriptionelles Zielgen des onkogenen Notch1 ist Trib2¹⁰¹, welches wiederum C/EBP α -p42 funktionell durch Degradation inaktiviert⁹⁹⁻¹⁰⁰. Eine hohe Trib2-Expression zeigen AML-Patienten mit einer gestörten C/EBP α -Funktion¹⁰⁰⁻¹⁰¹. Bei der Induktion der miR-30c mittels der verwendeten C/EBP α -p42 induzierbaren Zelllinie zeigt sich eine Reduzierung des Proteinlevels von Trib2 (Abbildung 19). Diese Supprimierung findet zeitlich versetzt zur Reduzierung von Notch1 (Abbildung 16) statt. Die Inhibierung von Trib2 ist vermutlich kein direkter Effekt von C/EBP α -p42. Die voran gegangenen Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die Inhibierung von Trib2 ein Resultat der durch C/EBP α -p42 erhöhten Expressierung der miR-30c und dem daraus resultierenden Block von Notch1 ist. Diese Ergebnisse sind auch ein Anzeichen dafür, dass es sich beim Zusammenspiel zwischen C/EBP α , miR-30c, Notch1 und Trib2 um eine Rückkopplungsschleife, einen sogenannten *feedback loop* handeln könnte (Abbildung 24).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine transiente Transfektion mit miR-30c blockenden Oligonukleotiden (LNAs) während der granulozytären Differenzierung zu einer Inhibierung des myeloiden Oberflächenproteins CD11b führt (Abbildung 23). Diese beobachteten Effekte zeigen sich vornehmlich in der frühen Granulopoese. Dass die miR-30c in der frühen granulozytären Differenzierung eine entscheidende Rolle spielt, ließen auch schon die Ergebnisse der C/EBP α -induzierbaren Zelllinie (Abbildung 7A) sowie der primären humanen Vorläuferzellen (Abbildung 8B) vermuten, in denen nach Induktion des granulozytären Programms ein sofortiger Anstieg der miR-30c Expression beobachtet werden konnte.

Diese Resultate zeigen, dass die miR-30c eine wichtige Vermittlerrolle in der frühen C/EBP α -induzierten granulozytären Differenzierung spielt. Die Anwesenheit der miR-30c ist notwendig, um Notch1 zu blocken und so die myeloide Differenzierung zu induzieren. Die beobachteten Effekte beruhen nur auf transienten Transfektionen, daher könnten die Effekte mit einer stabilen lentiviralen Transduktion noch weitaus stärker sein.

Die negative regulatorische Wirkung einer miRNA findet meist auf translationaler Ebene statt und wird über eine oder mehrere miRNA-Bindesequenzen in der 3'UTR der Ziel-mRNA vermittelt. Zur Verifizierung dieses Mechanismus wurde ein Luziferase-Reporter-Assay für die potentielle spezifische Bindung der miR-30c an die 3'UTR von *NOTCH1* durchgeführt. Um die Spezifität der gefundenen Bindesequenz zu belegen, wurden in diese Punktmutationen eingebracht, welche zum Ausbleiben eines inhibitorischen Effektes im Luziferase-Assay führten. Es zeigte sich, dass zwischen der miR-30c und der 3'UTR von *NOTCH1* eine direkte Interaktion besteht und es sich somit um eine miR-30c-spezifische Inhibierung von Notch1 handelt (Abbildung 21). Notch1 konnte anhand dieser Ergebnisse als ein neues direktes Ziel der miR-30c in der granulozytären Differenzierung bestätigt werden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die miR-30c eine wichtige Rolle in der durch C/EBP α -induzierten myeloiden Differenzierung spielt (Abbildung 24A). Die Resultate deuten an, dass die miR-30c über die Hemmung von Notch1 und Trib2 handelt, um die granulozytäre Differenzierung zu fördern (Abbildung 24A). Ein Block der miR-30c hat einen starken Einfluss auf die vermehrte Expression von Notch1 (Abbildung 24B) und somit vermutlich auch auf die Regulation von Trib2 und wiederum C/EBP α . Im Kontext mit bisherigen Publikationen⁹⁹⁻¹⁰¹ zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass C/EBP α , miR-30c, Notch1 und Trib2 zusammen eine wichtige Rolle in der granulozytären Differenzierung sowie vermutlich der AML spielen. Die miR-30c spielt dabei eine entscheidende Rolle bei der C/EBP α -vermittelten Notch1-Inhibierung sowie der Expression des myeloiden Oberflächenmarkers CD11b. Dieses neue molekulare Netzwerk zeigt die miR-30c als einen neuen Biomarker sowie Notch1 als potentiell therapeutisches Ziel in der AML auf.

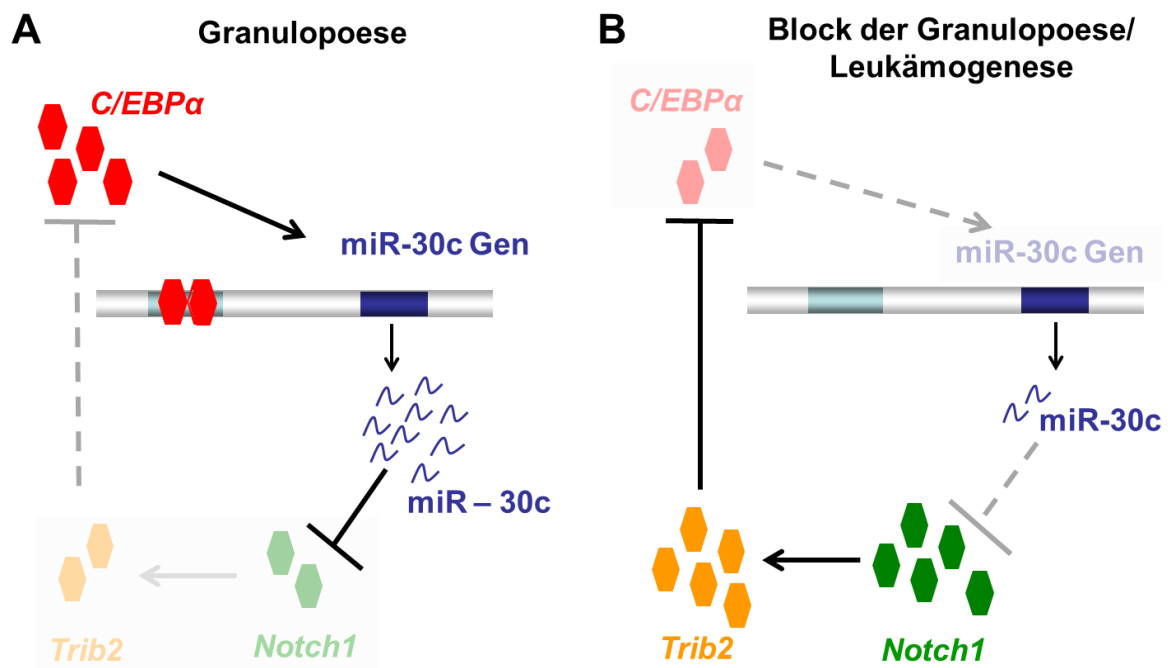


Abbildung 24: Model des Netzwerkes von C/EBP α , miR-30c und Notch1 während der Granulopoese und AML. (A) Während der Granulopoese transaktiviert C/EBP α die miR-30c, was wiederum zu einem Block von Notch1 und Trib2 und somit zur myeloiden Differenzierung führt. (B) Während der AML, ist C/EBP α meist fehlreguliert und kann somit die miR-30c nicht transaktivieren. Ein Block der miR-30c führt zu einer fehlenden Inhibition von Notch1 und Trib2 und somit zur Degradation von C/EBP α -p42 und Induzierung einer AML.

4.4 Bedeutung der miR-30c in der AML

Bei der Entstehung einer AML kommt es am häufigsten zu einer Deregulation von Transkriptionsfaktoren⁶. Ein wichtiger Tumorsuppressor in der myeloiden Differenzierung ist der Transkriptionsfaktor C/EBP α . In den verschiedenen Subtypen der AML liegt in ca. 50% der Fälle eine fehlende Expression, Dysregulation oder Mutation von C/EBP α vor⁵⁶⁻⁶⁰. Das C/EBP α eine große Rolle in der Hämatopoese und Leukämogenese spielt, konnte bereits in einem Mausmodell gezeigt werden. Für CEBPA-Mutationen homozygote Individuen zeigten eine Störung der myeloiden Differenzierung der Vorläuferzellen im Knochenmark und entwickelten so eine AML¹⁹¹. Ebenso wurde schon beschrieben, dass verschiedene durch C/EBP α regulierte miRNAs mit einer tumorsuppressiven Wirkung wie z.B. die miR-34a¹³⁸,

miR-223¹³⁶⁻¹³⁷ und miR-29a/b¹³⁹ in verschiedenen AML-Subtypen reduziert exprimiert werden und so ihre Ziele nicht mehr wirkungsvoll regulieren können.

Da C/EBP α die Expression der miR-30c regulativ beeinflusst (Abbildung 7 und Abbildung 14), war anzunehmen, dass es bei malignen transformierten Zellen mit deregulierter C/EBP α Expression ebenfalls eine verminderte Expression der miR-30c vorliegen könnte. Aufgrund dessen war eine denkbare Störung der miR-30c in verschiedenen AML-Subtypen, in denen C/EBP α nicht exprimiert, fehlreguliert oder mutiert ist, zu vermuten. Auch andere Arbeitsgruppen konnten bereits eine reduzierte Expression der miR-30c in leukämischen Zellen von AML Patienten zeigen¹⁷¹⁻¹⁷². In dieser Arbeit zeigte sich bei den Analysen von AML-Patientenproben wie vermutet, dass die miR-30c in den verschiedenen AML-Subtypen vermindert exprimiert wird (Abbildung 9). Zum Vergleich der miR-30c Expressionslevel wurden Knochenmarkszellen von gesunden Spendern, welche keine nachgewiesenen Mutationen oder Fehlfunktion von *CEBPA* aufwiesen, verwendet. Eine Deregulation von C/EBP α hat somit scheinbar eine negative Auswirkung auf die Expression der miR-30c. Aber auch in Studien, welche sich mit verschiedenen anderen Krebserkrankungen wie NSCLC¹⁷⁷, hämophagozytische Lymphohistiozytose¹⁷⁸, Multiples Myelom¹⁷⁹, Prostata-¹⁸⁰ sowie Mamakarzinom^{149,181} beschäftigten, konnte eine geringere bzw. reduzierte Expression der miR-30c in Patientenproben festgestellt werden.

Veränderungen im *CEBPA*-Gen selbst werden für ungefähr 10% aller AMLs⁵⁹ beschrieben und sind in der normal zytogenetischen (NK) AML vorherrschend⁵⁵⁻⁵⁶. Bei jungen AML-Patienten sind diese in 13 % bis 19 % der Fälle zu finden^{56,197}. Um den Einfluss des deregulierten *CEBPAs* durch eigene Mutationen auf die miR-30c zu untersuchen, wurden die Expressionslevel der miRNA in Proben von NK-AML-Patienten mit verschiedenen *CEBPA*-Mutationen analysiert. Bei der Analyse der NK-AML Patientenproben mit monoallelischen bzw. biallelischen *CEBPA*-Mutationen zeigte sich deutlich, dass die miR-30c vermindert exprimiert wird (Abbildung 10). Der Vergleich der miR-30c Expression erfolgte hier mit NK-AML-Patientenproben, welche keine nachgewiesene Mutation von *CEBPA* aufwiesen. Dies zeigt deutlich, dass die Störung von *CEBPA* eine negative Wirkung auf die Expression der miR-30c hat.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit kann man die miR-30c, in Bezug auf die AML, als Tumorsuppressor einteilen. Bereits weitere Studien bei Gebärmutterhalskrebs¹⁵⁰, Prostatakarzinom¹⁸⁰ und auch bei AML mit *NPM1* Mutationen¹⁵² konnten ebenfalls eine tumorsupprimierende Wirkung der miR-30c zeigen. Aufgrund der reduzierten miR-30c Expression in den verschiedenen AML-Subtypen sowie der tumorsuppressiven Wirkung werden die Ziele nicht mehr wirkungsvoll negativ reguliert und es kann somit zu einer massiven Zunahme von onkogenen Faktoren kommen. Man könnte somit eine erhöhte Expression von Notch1 in der AML erwarten. Es wurde bereits gezeigt, dass Notch1 in soliden Tumoren sowie im hämatologischen System sowohl eine onkogene als auch eine tumorsuppressive Wirkung haben kann⁸⁸. In verschiedene AML-Zelllinien und primären AML-Zellen konnte Notch1 Protein nachgewiesen werden⁹⁵. Bei einer weiteren Untersuchung von AML-Patientenproben konnte eine Hyperexpression von Notch1 in ca. 7% der Fälle nachgewiesen werden, während die restlichen Patienten eine geringe Expression von Notch1 aufwiesen. Diese Hyperexpression von Notch1 korreliert signifikant mit der morphologischen Subgruppe M0/1, eine AML ohne morphologische Reifung⁹⁶. Andererseits konnte ebenso die tumorsuppressive Wirkung von Notch1 bei einer weiteren Untersuchung von humanen AML-Patientenproben sowie AML-initiierenden Zellen eines Mausmodells gezeigt werden. In diesen untersuchten Proben wurde Notch1 unterdrückt. Des Weiteren führte hier eine Aktivierung von Notch1 zu einer raschen Hemmung des Zellzyklus, der Differenzierung und Apoptose von AML-initiierenden Zellen. Zudem kommt es durch die Inaktivierung von Notch zum Verlust des myeloiden Tumorsuppressors Tet2 und somit zur Induktion einer AML-ähnlichen Krankheit¹⁰². Wiederum ist bekannt, dass Trib2 ein direktes Zielgen von Notch1 ist¹⁰¹, und dessen Aktivierung zu einer proteosomalen Degradierung von C/EBP α -p42 und somit zur Inaktivierung seiner Funktionen führt, was eine kritische Rolle in der Entstehung einer AML spielt¹⁰⁰. Des Weiteren zeigen AML-Patienten mit einer gestörten C/EBP α -Funktion eine hohe Trib2-Expression¹⁰⁰⁻¹⁰¹. Durch die Transaktivierung von C/EBP α konnte in der vorliegenden Arbeit eine Hemmung von Trib2 beobachtet werden (Abbildung 19). Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse scheint C/EBP α -p42 im Umkehrschluss ebenfalls eine vermittelnde Rolle bei der Inhibierung von

Trib2 zu spielen. Dies sind erste Hinweise, dass zwischen C/EBP α , der miR-30c, Notch1 und Trib2 ein sogenannter *feedback-loop* besteht.

Weitere Analysen der miR-30c Expression sowie des Proteinlevels von C/EBP α , Notch1 und Trib2 in AML-Patientenproben sowie in *in vivo*-Experimenten könnten Aufschluss über eine mögliche Korrelation geben und so wichtige Anhaltspunkte für einen bestehenden Zusammenhang liefern. Es ist aber weiterhin möglich, dass Notch1 in der AML sowie in der Granulopoese durch weitere miRNAs reguliert wird. Zudem wurde aufgrund verschiedenster Untersuchungen in diversen Krebserkrankungen die miR-30c bereits als neuer nützlicher prognostischer Faktor vorgeschlagen^{177-178,180}. Eine prognostische Relevanz der miR-30c könnte somit auch bei der AML vorliegen, dies müsste aber in weiteren Analysen von AML-Patientenproben genauer untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor CCAAT Enhancer Binding Protein alpha (C/EBP α) ist ein Hauptregulator in der Granulopoese und häufig gestört in der akuten myeloischen Leukämie (AML). Mutationen im *CEBPA*-Gen werden für ungefähr 10% alle AML-Fälle beschrieben. Der Verlust der C/EBP α -Funktion führt zu einem Block der myeloiden Differenzierung. Einen Einfluss auf die Differenzierung haben auch microRNAs (miRs), die eine neue Gruppe von Genregulatoren darstellen. MiRs sind kleine, nicht proteinkodierende RNAs, welche vor allem posttranskriptionell eine Wirkung auf ihre Ziele haben. Spezifisch für die Granulopoese konnte bereits gezeigt werden, dass C/EBP α verschiedene miRNAs wie die miR-223, miR-34a und miR-29a/b direkt reguliert.

In der vorliegenden Arbeit konnte die miR-30c als ein neues funktionelles Ziel von C/EBP α während der frühen granulozytären Differenzierung identifiziert werden. Es zeigte sich, dass die Wildtypform C/EBP α -p42 die Expression der miR-30c direkt reguliert, wohingegen die Isoform C/EBP α -p30 dies nicht kann. Des Weiteren konnte, während der induzierten granulozytären Differenzierung sowohl durch G-CSF in primären humanen CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen als auch durch ATRA in der Zelllinie U937, eine positive Regulation der miR-30c beobachtet werden. Immer mehr Studien zeigen inzwischen, dass die Fehlregulation von miRNAs zur Förderung der Tumorgenese beitragen kann. Die Degradation von C/EBP α sowie dessen funktionelle Inaktivierung sind ein entscheidendes Merkmal bei der Entstehung einer AML. Bei der Untersuchung der Bedeutung der miR-30c für die Leukämogenese zeigte sich in verschiedenen Subtypen der AML durchgängig ein vermindertes Expressionslevel der miR-30c. Vor allem NK-AML Patienten, welche eine abnormale C/EBP α -Funktion aufgrund einer mono- bzw. biallelischen *CEBPA*-Mutation zeigen, wiesen ein signifikant reduziertes Expressionslevel der miR-30c auf. Bei der Untersuchung der einzelnen Entwicklungsstufen von Granulozyten aus dem Knochenmark von Mäusen zeigte sich entgegen den Erwartungen nur eine hohe Expression der miR-30c in den reifen Granulozyten, wo C/EBP α keine entscheidende Rolle mehr spielt. Bei konditionellen C/EBP α -Knockout-Mäusen konnte eine signifikante Herunterregulation der miR-30c Expression im Knochenmark beobachtet werden.

Des Weiteren konnte Notch1 als ein neues direktes Ziel der miR-30c identifiziert werden. Sowohl eine Überexpression von C/EBP α als auch der miR-30c führen zu einer Reduzierung von Notch1 auf Protein- aber nicht auf mRNA-Ebene. Durch die Transaktivierung von C/EBP α konnte ebenfalls eine Hemmung von Trib2 beobachtet werden. Die vorliegenden Ergebnisse sind ein erster Hinweis, dass C/EBP α -p42 im Umkehrschluss ebenfalls eine vermittelnde Rolle bei der Inhibierung von Trib2 zu spielen scheint. Letztendlich konnte gezeigt werden, dass die miR-30c eine wichtige Rolle in der C/EBP α -vermittelten Inhibierung von Notch1 spielt. Durch einen Block der miR-30c kommt es zur Aufhebung der C/EBP α -induzierten Hemmung der Proteinexpression von Notch1. Zudem führt ein Block der miR-30c zu einer verminderten Expression des myeloiden Oberflächenmarkers CD11b. Dies verdeutlicht ebenfalls, dass die miR-30c wichtig ist für C/EBP α bei der Induktion der myeloiden Differenzierung.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass C/EBP α , miR-30c und Notch1 zusammen eine kritische Rolle in der granulozytären Differenzierung und AML spielen. Dies ist ein erster Hinweis für eine sogenannten *feedback-loop*, in dem vermutlich Trib2 ebenfalls eine kritische Rolle einnimmt.

6 Literaturverzeichnis

1. Rieger MA, Schroeder T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(12).
2. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol.* 2006;169(2):338-346.
3. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.* 1984;133(1):157-165.
4. Herold G. Innere Medizin: Eine Vorlesungsorientierte Darstellung; Unter Berücksichtigung Des Gegenstandskataloges Für Die Ärztliche Prüfung; Mit ICD 10-Schlüssel Im Text Und Stichwortverzeichnis. Köln: Herold; 2013.
5. Lawrie CH. MicroRNAs in hematological malignancies. *Blood Rev.* 2013;27(3):143-154.
6. Tenen DG. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(2):89-101.
7. Brown CM, Larsen SR, Iland HJ, Joshua DE, Gibson J. Leukaemias into the 21st century: part 1: the acute leukaemias. *Intern Med J.* 2012;42(11):1179-1186.
8. Deschler B, Lubbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer.* 2006;107(9):2099-2107.
9. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 1976;33(4):451-458.
10. Bennett JM, Andersen JW, Cassileth PA. Long term survival in acute myeloid leukemia: the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) experience. *Leuk Res.* 1991;15(4):223-227.
11. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med.* 1985;103(4):620-625.
12. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999;341(14):1051-1062.
13. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol.* 1999;17(12):3835-3849.
14. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009;114(5):937-951.

15. Dastugue N, Payen C, Lafage-Pochitaloff M, et al. Prognostic significance of karyotype in de novo adult acute myeloid leukemia. The BGMT group. *Leukemia*. 1995;9(9):1491-1498.
16. Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*. 1998;92(7):2322-2333.
17. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, Meijer J, et al. Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. *Hematol J*. 2003;4(1):31-40.
18. Frohling S, Dohner H. Disruption of C/EBPalpha function in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351(23):2370-2372.
19. Nerlov C. C/EBPalpha mutations in acute myeloid leukaemias. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(5):394-400.
20. Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC, et al. Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res*. 1998;58(18):4173-4179.
21. Alsabeh R, Brynes RK, Slovak ML, Arber DA. Acute myeloid leukemia with t(6;9) (p23;q34): association with myelodysplasia, basophilia, and initial CD34 negative immunophenotype. *Am J Clin Pathol*. 1997;107(4):430-437.
22. Schoch C, Haase D, Haferlach T, et al. Fifty-one patients with acute myeloid leukemia and translocation t(8;21)(q22;q22): an additional deletion in 9q is an adverse prognostic factor. *Leukemia*. 1996;10(8):1288-1295.
23. Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, et al. All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1997;337(15):1021-1028.
24. Akira S, Isshiki H, Sugita T, et al. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J*. 1990;9(6):1897-1906.
25. Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev*. 1991;5(9):1538-1552.
26. Lyons SE, Shue BC, Lei L, Oates AC, Zon LI, Liu PP. Molecular cloning, genetic mapping, and expression analysis of four zebrafish *c/ebp* genes. *Gene*. 2001;281(1-2):43-51.
27. Roman C, Platero JS, Shuman J, Calame K. Ig/EBP-1: a ubiquitously expressed immunoglobulin enhancer binding protein that is similar to C/EBP and heterodimerizes with C/EBP. *Genes Dev*. 1990;4(8):1404-1415.
28. Ron D, Habener JF. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev*. 1992;6(3):439-453.
29. Williams SC, Cantwell CA, Johnson PF. A family of C/EBP-related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers in vitro. *Genes Dev*. 1991;5(9):1553-1567.

30. Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*. 1988;240(4860):1759-1764.
31. Scott LM, Civin CI, Rorth P, Friedman AD. A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells. *Blood*. 1992;80(7):1725-1735.
32. Morosetti R, Park DJ, Chumakov AM, et al. A novel, myeloid transcription factor, C/EBP epsilon, is upregulated during granulocytic, but not monocytic, differentiation. *Blood*. 1997;90(7):2591-2600.
33. Yamanaka R, Kim GD, Radomska HS, et al. CCAAT/enhancer binding protein epsilon is preferentially up-regulated during granulocytic differentiation and its functional versatility is determined by alternative use of promoters and differential splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(12):6462-6467.
34. Hirai H, Zhang P, Dayaram T, et al. C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis. *Nat Immunol*. 2006;7(7):732-739.
35. Hendricks-Taylor LR, Bachinski LL, Siciliano MJ, et al. The CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP alpha) gene (CEBPA) maps to human chromosome 19q13.1 and the related nuclear factor NF-IL6 (C/EBP beta) gene (CEBPB) maps to human chromosome 20q13.1. *Genomics*. 1992;14(1):12-17.
36. Antonson P, Xanthopoulos KG. Molecular cloning, sequence, and expression patterns of the human gene encoding CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha). *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;215(1):106-113.
37. Birkenmeier EH, Gwynn B, Howard S, et al. Tissue-specific expression, developmental regulation, and genetic mapping of the gene encoding CCAAT/enhancer binding protein. *Genes Dev*. 1989;3(8):1146-1156.
38. Lin FT, MacDougald OA, Diehl AM, Lane MD. A 30-kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein alpha message: transcriptional activator lacking antimitotic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(20):9606-9610.
39. Ossipow V, Descombes P, Schibler U. CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(17):8219-8223.
40. Nerlov C, Ziff EB. Three levels of functional interaction determine the activity of CCAAT/enhancer binding protein-alpha on the serum albumin promoter. *Genes Dev*. 1994;8(3):350-362.
41. Mueller BU, Pabst T. C/EBPalpha and the pathophysiology of acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2006;13(1):7-14.
42. Nerlov C, Ziff EB. CCAAT/enhancer binding protein-alpha amino acid motifs with dual TBP and TFIIB binding ability co-operate to activate transcription in both yeast and mammalian cells. *EMBO J*. 1995;14(17):4318-4328.

43. Koschmieder S, Halmos B, Levantini E, Tenen DG. Dysregulation of the C/EBPalpha differentiation pathway in human cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(4):619-628.
44. Rosenbauer F, Tenen DG. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(2):105-117.
45. Radomska HS, Huettner CS, Zhang P, Cheng T, Scadden DT, Tenen DG. CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol Cell Biol*. 1998;18(7):4301-4314.
46. Zhang P, Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, et al. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity*. 2004;21(6):853-863.
47. Behre G, Singh SM, Liu H, et al. Ras signaling enhances the activity of C/EBP alpha to induce granulocytic differentiation by phosphorylation of serine 248. *J Biol Chem*. 2002;277(29):26293-26299.
48. Zhang DE, Zhang P, Wang ND, Hetherington CJ, Darlington GJ, Tenen DG. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(2):569-574.
49. Smith LT, Hohaus S, Gonzalez DA, Dziennis SE, Tenen DG. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood*. 1996;88(4):1234-1247.
50. Hohaus S, Petrovick MS, Voso MT, Sun Z, Zhang DE, Tenen DG. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol*. 1995;15(10):5830-5845.
51. Ford AM, Bennett CA, Healy LE, Towatari M, Greaves MF, Enver T. Regulation of the myeloperoxidase enhancer binding proteins Pu1, C-EBP alpha, -beta, and -delta during granulocyte-lineage specification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(20):10838-10843.
52. Oelgeschlager M, Nuchprayoon I, Luscher B, Friedman AD. C/EBP, c-Myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter. *Mol Cell Biol*. 1996;16(9):4717-4725.
53. Khanna-Gupta A, Zibello T, Simkevich C, Rosmarin AG, Berliner N. Sp1 and C/EBP are necessary to activate the lactoferrin gene promoter during myeloid differentiation. *Blood*. 2000;95(12):3734-3741.
54. Umek RM, Friedman AD, McKnight SL. CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science*. 1991;251(4991):288-292.
55. Gombart AF, Hofmann WK, Kawano S, et al. Mutations in the gene encoding the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein alpha in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Blood*. 2002;99(4):1332-1340.

56. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, et al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet.* 2001;27(3):263-270.
57. Pabst T, Mueller BU, Harakawa N, et al. AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat Med.* 2001;7(4):444-451.
58. Paz-Priel I, Friedman A. C/EBPalpha dysregulation in AML and ALL. *Crit Rev Oncog.* 2011;16(1-2):93-102.
59. Reckzeh K, Cammenga J. Molecular mechanisms underlying deregulation of C/EBPalpha in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 2010;91(4):557-568.
60. Schuster MB, Porse BT. C/EBPalpha: a tumour suppressor in multiple tissues? *Biochim Biophys Acta.* 2006;1766(1):88-103.
61. Wang C, Chen X, Wang Y, Gong J, Hu G. C/EBPalpha p30 plays transcriptional regulatory roles distinct from C/EBPalpha p42. *Cell Res.* 2007;17(4):374-383.
62. Radomska HS, Basseres DS, Zheng R, et al. Block of C/EBP alpha function by phosphorylation in acute myeloid leukemia with FLT3 activating mutations. *J Exp Med.* 2006;203(2):371-381.
63. Zheng R, Friedman AD, Levis M, Li L, Weir EG, Small D. Internal tandem duplication mutation of FLT3 blocks myeloid differentiation through suppression of C/EBPalpha expression. *Blood.* 2004;103(5):1883-1890.
64. Guibal FC, Alberich-Jorda M, Hirai H, et al. Identification of a myeloid committed progenitor as the cancer-initiating cell in acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 2009;114(27):5415-5425.
65. Perrotti D, Cesi V, Trotta R, et al. BCR-ABL suppresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2. *Nat Genet.* 2002;30(1):48-58.
66. Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, et al. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood.* 2002;100(8):2717-2723.
67. Mohr OL. Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila*. *Genetics.* 1919;4(3):275-282.
68. Hamada Y, Kadokawa Y, Okabe M, Ikawa M, Coleman JR, Tsujimoto Y. Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality. *Development.* 1999;126(15):3415-3424.
69. Swiatek PJ, Lindsell CE, del Amo FF, Weinmaster G, Gridley T. Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev.* 1994;8(6):707-719.
70. Nye JS, Kopan R, Axel R. An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. *Development.* 1994;120(9):2421-2430.

71. Kopan R, Nye JS, Weintraub H. The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. *Development*. 1994;120(9):2385-2396.
72. Apelqvist A, Li H, Sommer L, et al. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature*. 1999;400(6747):877-881.
73. Milner LA, Bigas A, Kopan R, Brashem-Stein C, Bernstein ID, Martin DI. Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(23):13014-13019.
74. Schroeder T, Just U. Notch signalling via RBP-J promotes myeloid differentiation. *EMBO J*. 2000;19(11):2558-2568.
75. Pui JC, Allman D, Xu L, et al. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity*. 1999;11(3):299-308.
76. Radtke F, Wilson A, Stark G, et al. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity*. 1999;10(5):547-558.
77. Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, MacDonald HR. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol*. 2004;5(3):247-253.
78. Jehn BM, Bielke W, Pear WS, Osborne BA. Cutting edge: protective effects of notch-1 on TCR-induced apoptosis. *J Immunol*. 1999;162(2):635-638.
79. Shelly LL, Fuchs C, Miele L. Notch-1 inhibits apoptosis in murine erythroleukemia cells and is necessary for differentiation induced by hybrid polar compounds. *J Cell Biochem*. 1999;73(2):164-175.
80. Go MJ, Eastman DS, Artavanis-Tsakonas S. Cell proliferation control by Notch signaling in Drosophila development. *Development*. 1998;125(11):2031-2040.
81. Milner LA, Bigas A. Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood*. 1999;93(8):2431-2448.
82. Ohishi K, Varnum-Finney B, Flowers D, Anasetti C, Myerson D, Bernstein ID. Monocytes express high amounts of Notch and undergo cytokine specific apoptosis following interaction with the Notch ligand, Delta-1. *Blood*. 2000;95(9):2847-2854.
83. Robey E, Chang D, Itano A, et al. An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. *Cell*. 1996;87(3):483-492.
84. Stier S, Cheng T, Dombkowski D, Carlesso N, Scadden DT. Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood*. 2002;99(7):2369-2378.
85. Li L, Milner LA, Deng Y, et al. The human homolog of rat Jagged1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with Notch1. *Immunity*. 1998;8(1):43-55.
86. Varnum-Finney B, Purton LE, Yu M, et al. The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood*. 1998;91(11):4084-4091.

87. Walker L, Lynch M, Silverman S, et al. The Notch/Jagged pathway inhibits proliferation of human hematopoietic progenitors in vitro. *Stem Cells*. 1999;17(3):162-171.
88. Leong KG, Karsan A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood*. 2006;107(6):2223-2233.
89. Grabher C, von Boehmer H, Look AT. Notch 1 activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(5):347-359.
90. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2004;306(5694):269-271.
91. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med*. 2011;208(7):1389-1401.
92. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475(7354):101-105.
93. Fu L, Kogoshi H, Nara N, Tohda S. NOTCH1 mutations are rare in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2006;47(11):2400-2403.
94. Palomero T, McKenna K, J ON, et al. Activating mutations in NOTCH1 in acute myeloid leukemia and lineage switch leukemias. *Leukemia*. 2006;20(11):1963-1966.
95. Tohda S, Nara N. Expression of Notch1 and Jagged1 proteins in acute myeloid leukemia cells. *Leuk Lymphoma*. 2001;42(3):467-472.
96. Sliwa T, Awsa S, Vesely M, et al. Hyperexpression of NOTCH-1 is found in immature acute myeloid leukemia. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(3):882-889.
97. Chiaramonte R, Basile A, Tassi E, et al. A wide role for NOTCH1 signaling in acute leukemia. *Cancer Lett*. 2005;219(1):113-120.
98. Klinakis A, Lobry C, Abdel-Wahab O, et al. A novel tumour-suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukaemia. *Nature*. 2011;473(7346):230-233.
99. Dedhia PH, Keeshan K, Uljon S, et al. Differential ability of Tribbles family members to promote degradation of C/EBPalpha and induce acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2010;116(8):1321-1328.
100. Keeshan K, He Y, Wouters BJ, et al. Tribbles homolog 2 inactivates C/EBPalpha and causes acute myelogenous leukemia. *Cancer Cell*. 2006;10(5):401-411.
101. Wouters BJ, Jorda MA, Keeshan K, et al. Distinct gene expression profiles of acute myeloid/T-lymphoid leukemia with silenced CEBPA and mutations in NOTCH1. *Blood*. 2007;110(10):3706-3714.
102. Lobry C, Ntziachristos P, Ndiaye-Lobry D, et al. Notch pathway activation targets AML-initiating cell homeostasis and differentiation. *J Exp Med*. 2013;210(2):301-319.

103. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-854.
104. Pasquinelli AE, Hunter S, Bracht J. MicroRNAs: a developing story. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15(2):200-205.
105. Bruneau BG. Developmental biology: tiny brakes for a growing heart. *Nature*. 2005;436(7048):181-182.
106. Cuellar TL, McManus MT. MicroRNAs and endocrine biology. *J Endocrinol*. 2005;187(3):327-332.
107. De Guire V, Caron M, Scott N, et al. Designing small multiple-target artificial RNAs. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(13):e140.
108. Sylvestre Y, De Guire V, Querido E, et al. An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J Biol Chem*. 2007;282(4):2135-2143.
109. Garzon R, Croce CM. MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2008;15(4):352-358.
110. Marcucci G, Radmacher MD, Maharry K, et al. MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2008;358(18):1919-1928.
111. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15-20.
112. Malumbres M. miRNAs and cancer: an epigenetics view. *Mol Aspects Med*. 2013;34(4):863-874.
113. Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004;23(20):4051-4060.
114. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004;432(7014):231-235.
115. Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415-419.
116. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004;303(5654):95-98.
117. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003;17(24):3011-3016.
118. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science*. 2001;293(5531):834-838.
119. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. 2009;11(3):228-234.

120. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003;115(7):787-798.
121. Shivdasani RA. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood*. 2006;108(12):3646-3653.
122. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431(7006):350-355.
123. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-297.
124. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(5):376-385.
125. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*. 2004;303(5654):83-86.
126. Fazi F, Racanicchi S, Zardo G, et al. Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein. *Cancer Cell*. 2007;12(5):457-466.
127. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, et al. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*. 2008;451(7182):1125-1129.
128. Felli N, Pedini F, Romania P, et al. MicroRNA 223-dependent expression of LMO2 regulates normal erythropoiesis. *Haematologica*. 2009;94(4):479-486.
129. Felli N, Fontana L, Pelosi E, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(50):18081-18086.
130. Wang Q, Huang Z, Xue H, et al. MicroRNA miR-24 inhibits erythropoiesis by targeting activin type I receptor ALK4. *Blood*. 2008;111(2):588-595.
131. Sun SM, Dijkstra MK, Bijkerk AC, et al. Transition of highly specific microRNA expression patterns in association with discrete maturation stages of human granulopoiesis. *Br J Haematol*. 2011;155(3):395-398.
132. Surdziel E, Cabanski M, Dallmann I, et al. Enforced expression of miR-125b affects myelopoiesis by targeting multiple signaling pathways. *Blood*. 2011;117(16):4338-4348.
133. Zhou B, Wang S, Mayr C, Bartel DP, Lodish HF. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(17):7080-7085.
134. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*. 2007;316(5824):608-611.
135. Ramkissoon SH, Mainwaring LA, Ogasawara Y, et al. Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. *Leuk Res*. 2006;30(5):643-647.
136. Fazi F, Rosa A, Fatica A, et al. A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell*. 2005;123(5):819-831.

137. Pulikkan JA, Dengler V, Peramangalam PS, et al. Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010;115(9):1768-1778.
138. Pulikkan JA, Peramangalam PS, Dengler V, et al. C/EBPalpha regulated microRNA-34a targets E2F3 during granulopoiesis and is down-regulated in AML with CEBPA mutations. *Blood*. 2010;116(25):5638-5649.
139. Eyholzer M, Schmid S, Wilkens L, Mueller BU, Pabst T. The tumour-suppressive miR-29a/b1 cluster is regulated by CEBPA and blocked in human AML. *Br J Cancer*. 2010;103(2):275-284.
140. Eiring AM, Harb JG, Neviani P, et al. miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell*. 2010;140(5):652-665.
141. Hackanson B, Bennett KL, Brena RM, et al. Epigenetic modification of CCAAT/enhancer binding protein alpha expression in acute myeloid leukemia. *Cancer Res*. 2008;68(9):3142-3151.
142. Li J, Donath S, Li Y, Qin D, Prabhakar BS, Li P. miR-30 regulates mitochondrial fission through targeting p53 and the dynamin-related protein-1 pathway. *PLoS Genet*. 2010;6(1):e1000795.
143. Martinez I, Cazalla D, Almstead LL, Steitz JA, DiMaio D. miR-29 and miR-30 regulate B-Myb expression during cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(2):522-527.
144. Wu T, Zhou H, Hong Y, Li J, Jiang X, Huang H. miR-30 family members negatively regulate osteoblast differentiation. *J Biol Chem*. 2012;287(10):7503-7511.
145. Zhang J, Zhang H, Liu J, et al. miR-30 inhibits TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocyte by targeting Snail1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;417(3):1100-1105.
146. Soh J, Iqbal J, Queiroz J, Fernandez-Hernando C, Hussain MM. MicroRNA-30c reduces hyperlipidemia and atherosclerosis in mice by decreasing lipid synthesis and lipoprotein secretion. *Nat Med*. 2013;19(7):892-900.
147. Wang G, Zhang H, He H, et al. Up-regulation of microRNA in bladder tumor tissue is not common. *Int Urol Nephrol*. 2010;42(1):95-102.
148. Rodriguez-Gonzalez FG, Sieuwerts AM, Smid M, et al. MicroRNA-30c expression level is an independent predictor of clinical benefit of endocrine therapy in advanced estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;127(1):43-51.
149. Yu F, Deng H, Yao H, Liu Q, Su F, Song E. Mir-30 reduction maintains self-renewal and inhibits apoptosis in breast tumor-initiating cells. *Oncogene*. 2010;29(29):4194-4204.
150. Zhou H, Xu X, Xun Q, et al. microRNA-30c negatively regulates endometrial cancer cells by targeting metastasis-associated gene-1. *Oncol Rep*. 2012;27(3):807-812.

151. Boominathan L. The guardians of the genome (p53, TA-p73, and TA-p63) are regulators of tumor suppressor miRNAs network. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29(4):613-639.
152. Russ AC, Sander S, Luck SC, et al. Integrative nucleophosmin mutation-associated microRNA and gene expression pattern analysis identifies novel microRNA - target gene interactions in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2011;96(12):1783-1791.
153. Merkerova M, Belickova M, Bruchova H. Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. *Eur J Haematol.* 2008;81(4):304-310.
154. Kefas B, Comeau L, Floyd DH, et al. The neuronal microRNA miR-326 acts in a feedback loop with notch and has therapeutic potential against brain tumors. *J Neurosci.* 2009;29(48):15161-15168.
155. Higuchi M, O'Brien D, Kumaravelu P, Lenny N, Yeoh EJ, Downing JR. Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia. *Cancer Cell.* 2002;1(1):63-74.
156. D'Alo F, Johansen LM, Nelson EA, et al. The amino terminal and E2F interaction domains are critical for C/EBP alpha-mediated induction of granulopoietic development of hematopoietic cells. *Blood.* 2003;102(9):3163-3171.
157. Shinjo K, Takeshita A, Ohnishi K, Ohno R. Granulocyte colony-stimulating factor receptor at various differentiation stages of normal and leukemic hematopoietic cells. *Leuk Lymphoma.* 1997;25(1-2):37-46.
158. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001;25(4):402-408.
159. Castoldi M, Schmidt S, Benes V, et al. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *RNA.* 2006;12(5):913-920.
160. Nelson PT, Baldwin DA, Kloosterman WP, Kauppinen S, Plasterk RH, Mourelatos Z. RAKE and LNA-ISH reveal microRNA expression and localization in archival human brain. *RNA.* 2006;12(2):187-191.
161. Thomsen R, Nielsen PS, Jensen TH. Dramatically improved RNA in situ hybridization signals using LNA-modified probes. *RNA.* 2005;11(11):1745-1748.
162. Valoczi A, Hornyik C, Varga N, Burgyan J, Kauppinen S, Havelda Z. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(22):e175.
163. Braasch DA, Corey DR. Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem Biol.* 2001;8(1):1-7.
164. Loyter A, Scangos G, Juricek D, Keene D, Ruddle FH. Mechanisms of DNA entry into mammalian cells. II. Phagocytosis of calcium phosphate DNA co-precipitate visualized by electron microscopy. *Exp Cell Res.* 1982;139(1):223-234.

165. Pritchard CC, Kroh E, Wood B, et al. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012;5(3):492-497.
166. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(9):2999-3004.
167. Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med*. 2005;353(17):1768-1771.
168. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):259-269.
169. Osada H, Takahashi T. MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2007;28(1):2-12.
170. Schotte D, Pieters R, Den Boer ML. MicroRNAs in acute leukemia: from biological players to clinical contributors. *Leukemia*. 2012;26(1):1-12.
171. Fuster O, Llop M, Dolz S, et al. Adverse prognostic value of MYBL2 overexpression and association with microRNA-30 family in acute myeloid leukemia patients. *Leuk Res*. 2013;37(12):1690-1696.
172. Ramsingh G, Koboldt DC, Trissal M, et al. Complete characterization of the microRNAome in a patient with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010;116(24):5316-5326.
173. Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, et al. Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science*. 1995;269(5227):1108-1112.
174. Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, et al. MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*. 2007;26(28):4148-4157.
175. Saumet A, Vetter G, Bouttier M, et al. Transcriptional repression of microRNA genes by PML-RARA increases expression of key cancer proteins in acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2009;113(2):412-421.
176. Velu CS, Baktula AM, Grimes HL. Gfi1 regulates miR-21 and miR-196b to control myelopoiesis. *Blood*. 2009;113(19):4720-4728.
177. Gu YF, Zhang H, Su D, et al. miR-30b and miR-30c expression predicted response to tyrosine kinase inhibitors as first line treatment in non-small cell lung cancer. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(23):4435-4439.
178. Bay A, Coskun E, Oztuzcu S, Ergun S, Yilmaz F, Aktekin E. Evaluation of the plasma micro RNA expression levels in secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2013;5(1):e2013066.
179. Zhao JJ, Lin J, Zhu D, et al. miR-30-5p functions as a tumor suppressor and novel therapeutic tool by targeting the oncogenic Wnt/beta-catenin/BCL9 pathway. *Cancer Res*. 2014;74(6):1801-1813.

180. Ling XH, Han ZD, Xia D, et al. MicroRNA-30c serves as an independent biochemical recurrence predictor and potential tumor suppressor for prostate cancer. *Mol Biol Rep.* 2014;41(5):2779-2788.
181. Fang Y, Shen H, Cao Y, et al. Involvement of miR-30c in resistance to doxorubicin by regulating YWHAZ in breast cancer cells. *Braz J Med Biol Res.* 2014;47(1):60-69.
182. Zaidi SK, Dowdy CR, van Wijnen AJ, et al. Altered Runx1 subnuclear targeting enhances myeloid cell proliferation and blocks differentiation by activating a miR-24/MKP-7/MAPK network. *Cancer Res.* 2009;69(21):8249-8255.
183. Bousquet M, Harris MH, Zhou B, Lodish HF. MicroRNA miR-125b causes leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(50):21558-21563.
184. Choong ML, Yang HH, McNiece I. MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis. *Exp Hematol.* 2007;35(4):551-564.
185. Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, et al. Prognostic significance of, and gene and microRNA expression signatures associated with, CEBPA mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with high-risk molecular features: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol.* 2008;26(31):5078-5087.
186. Su R, Lin HS, Zhang XH, et al. MiR-181 family: regulators of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia as well as potential therapeutic targets. *Oncogene.* 2014;0.
187. Hickey CJ, Schwind S, Radomska HS, et al. Lenalidomide-mediated enhanced translation of C/EBPalpha-p30 protein up-regulates expression of the antileukemic microRNA-181a in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013;121(1):159-169.
188. Rosa A, Ballarino M, Sorrentino A, et al. The interplay between the master transcription factor PU.1 and miR-424 regulates human monocyte/macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(50):19849-19854.
189. Sun Y, Sun J, Tomomi T, et al. PU.1-dependent transcriptional regulation of miR-142 contributes to its hematopoietic cell-specific expression and modulation of IL-6. *J Immunol.* 2013;190(8):4005-4013.
190. Ofir M, Hacohen D, Ginsberg D. MiR-15 and miR-16 are direct transcriptional targets of E2F1 that limit E2F-induced proliferation by targeting cyclin E. *Mol Cancer Res.* 2011;9(4):440-447.
191. Kirstetter P, Schuster MB, Bereshchenko O, et al. Modeling of C/EBPalpha mutant acute myeloid leukemia reveals a common expression signature of committed myeloid leukemia-initiating cells. *Cancer Cell.* 2008;13(4):299-310.
192. Su X, Qian C, Zhang Q, et al. miRNomes of haematopoietic stem cells and dendritic cells identify miR-30b as a regulator of Notch1. *Nat Commun.* 2013;4:2903.
193. Wu J, Zheng C, Fan Y, et al. Downregulation of microRNA-30 facilitates podocyte injury and is prevented by glucocorticoids. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(1):92-104.

194. Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* 2006;20(14):1885-1898.
195. Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, et al. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science.* 2006;312(5770):75-79.
196. Yang X, Ni W, Lei K. miR-200b suppresses cell growth, migration and invasion by targeting Notch1 in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Physiol Biochem.* 2013;32(5):1288-1298.
197. Boissel N, Renneville A, Biggio V, et al. Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood.* 2005;106(10):3618-3620.

Danksagung

Zum Abschluss möchte an dieser Stelle noch all denjenigen ganz herzlich danken, die mich bei der Durchführung und Anfertigung dieser Dissertation auf verschiedenste Art und Weise unterstützt haben.

Zuerst möchte ich mich bei **Prof. Dr. Sven-Erik Behrens** für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit und das entgegengebrachte Vertrauen bedanke. Ohne Ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. **Prof. Dr. med. Gerhard Behre** danke ich für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung und Betreuung. Ich danke zudem für die Möglichkeit absolut selbstständig und eigenverantwortlich arbeiten zu dürfen.

Herrn **Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schmoll** sowie Herrn **Prof. Dr. med. Dr. h.c Dietger Walter Niederwieser** danke ich in ihren Abteilungen als Doktorandin tätig gewesen sein zu dürfen sowie für die Zurverfügungstellung der Räumlichkeiten und Geräte.

Ein großer Dank gilt auch **Dr. Vikas Madan** und **Prof. Dr. Daniel Tenen**, vom Cancer Science Institut der Nationaluniversität Singapur, für die praktische Durchführung der Mausexperimente und der Überlassung der Maus-Knochenmarkproben.

Mein Dank gilt auch **den Patienten**, die durch die Bereitstellung ihrer Blut und Knochenmarkproben solche Projekte erst ermöglichen sowie **Prof. Dr. Dr. Niederwieser**, **Prof. Dr. Susanne Schnittger** vom Münchner Leukämielabor MLL und **Prof. Dr. Carsten Müller-Tidow** vom Universitätsklinikum Halle für die Überlassung dieser Patientenproben.

Der **Deutschen José Carreras Stiftung e.V.** danke ich ganz herzlich dafür, dass sie mir die Chance gegeben haben mit einem 3-jährigen Stipendium mich nur auf meine Dissertation zu konzentrieren. Aber auch der **Deutschen Forschungsge-**

meinschaft (DFG), Wilhelm-Sander-Stiftung und **Deutschen Krebshilfe**, welche durch ihre Mittel diese Arbeit gefördert haben, gilt mein Dank.

Dennis, Daniela, Jenz, Alex und **Carolina** – ich danke euch von ganzen Herzen für eure Unterstützung und Freundschaft in den vergangenen Jahren. Danke für die lustige und fröhliche Arbeitsatmosphäre – ich arbeite immer gern mit Euch zusammen. Danke **Dennis**, dass ich mit dir über alles reden konnte und du mich Dank deiner Art öfter mal auf andere Gedanken gebracht hast. **Alex, Daniela, Jenz** und **Carolina**, euch danke ich vor allem für eure fachliche Hilfe sowie die zahlreichen Diskussionen.

Schließlich gilt mein größter Dank meinen **Eltern, Schwiegereltern, Großeltern** und **meiner Schwester Anne**. Ich danke Euch für euren Glauben an mich, eurer Verständnis, die finanzielle Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion sowie die liebevolle Betreuung von Franz und Frida, wann immer es notwendig war. Danke!!

Ein besonderer Dank gilt natürlich auch meinen lieben Freunden **Tina** und **Schnatti**. Euch möchte ich für die wunderbaren Stunden der Ablenkung und den vielen Kaffee danken – die Tage und Abende in Eurer Gesellschaft waren für mich unverzichtbar!

Ein ganz besonders großer Dank gilt aber meinem Mann **Andreas**. Danke für deine grenzenlose Unterstützung und dein Verständnis für mich, ohne Dich hätte ich es nicht geschafft. Meinen zwei tollen Kindern **Franz** und **Frida** danke ich, dass sie mir gezeigt haben, dass es auch noch andere Dinge auf der Welt gibt als Arbeit.

Selbstständigkeitserklärung

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

Hiermit erkläre ich, Christiane Katzerke, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die aus fremden Quellen übernommenen Gedanken oder Graphiken sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für die Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Halle (Saale), 15.12.2014

Christiane Katzerke

Erklärung über bisherige Promotionsversuche

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

Halle (Saale), 15.12.2014

Christiane Katzerke

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christiane Katzerke geb. Kilian
Geburtsdatum: 19.08.1981
Geburtsort: Halle (Saale)
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder (2 und 5 Jahre)

Studium

06/2011 - wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Behre im Forschungslabor der Abteilung Hämatologie/ Onkologie des Universitätsklinikums Leipzig, Direktor: Prof. Dr. Dr. Niederwieser

06/2011 Wechsel der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Behre ans Universitätsklinikum Leipzig, Abteilung Hämatologie/ Onkologie, Prof. Dr. Dr. Niederwieser

09/2007 Beginn der Promotion zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

09/2006 – 05/2011 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Landeszentrum für Zell- und Gentherapie (LZG) Sachsen Anhalt, Universitätsklinikum Halle, Klinik für Innere Medizin IV, Prof. Dr. Schmoll, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerhard Behre

03/2006 Erlangung des akademischen Grades Diplom-Biologin durch Urkunde und Zeugnis der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Gesamtnote: 1,7)

06/2005 - 01/2006 Diplomarbeit: „Genetische Struktur und Fortpflanzung von *Stipa capillata* (L.) in Mitteleuropa“, am Institut für Botanik, Betreuer: Prof. Dr. Hensen

04/2003 - 01/2006 Hauptstudium mit Hauptfach Botanik und Nebenfächern: Zoologie, Bodenkunde und Naturschutz

10/2000 - 03/2006 Studium der Biologie (Diplom) an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Schulbildung

1991-2000 Europa-Gymnasium Dessau (Gesamtnote: 2,1)
1988-1991 23. Polytechnische Oberschule Dessau

Auszeichnungen und Preise

- 12/2011 Abstract Achievement Award der American Society of Hematology
- 09/2007-02/20011 Forschungsstipendium der Deutschen José Carreras Leukämie Stiftung e.V.

Zusatzinformationen

Mutterschutz und Erziehungszeit vom 05.10.2009 bis 31.07.2010 sowie vom 28.08.2012 bis 31.07.2013.

Halle (Saale), 15.12.2014

Christiane Katzerke

Veröffentlichungen

Publikationen

- Hensen I, **Kilian C**, Wagner V, Durka W, Pusch J, Wesche K (2010). Low genetic variability and strong differentiation among isolated populations of the rare steppe grass *Stipa capillata* L. in Central Europe. *Plant Biol* (Stuttg.). 2010 May 1;12(3):526-536.
- **Katzerke C**, Madan V, Gerloff D, Bräuer-Hartmann D, Hartmann J-U, Wurm AA, Müller-Tidow C, Schnittger S, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G (2013). C/EBP α -induced microRNA-30c directly targets Notch1 during granulopoiesis and is repressed in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013 Oct 3;122(14):2433-2442.
- Gerloff G, Grundler R, Wurm AA, Braeuer-Hartmann D, **Katzerke C**, Hartmann J-U, Madan V, Mueller-Tidow C, Duyster J, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G (2014). NF- κ B/STAT5/miR-155 network targets PU.1 in FLT3-ITD driven acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2014. doi: 10.1038/leu.2014.231. [Epub ahead of print]
- Braeuer-Hartmann D, Hartmann J-U, Gerloff D, **Katzerke C**, Falzacappa MV, Pellicci PG, Mueller-Tidow C, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G (2014). PML/RAR α -regulated miR-181a/b cluster targets the tumor suppressor RASSF1A in Acute Promyelocytic Leukemia. [submitted to *Cancer Research*]

Tagungsbeiträge (wurden in den entsprechenden Tagungsbänden bzw. Sonderausgaben publiziert)

Poster beim 53th Annual Meeting of the American Society of Hematology (ASH) in San Diego, California, USA, Dezember 2011

- **Katzerke C**, Madan V, Gerloff D, Braeuer-Hartmann D, Hartmann J-U, Mueller-Tidow C, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G (2011). C/EBP alpha-Induced MicroRNA 30c Inactivates Notch1 during Granulopoiesis and Is Downregulated in Acute Myeloid Leukemia, *Blood*. 2011;118(21):1021-1021.
- Braeuer-Hartmann D, Hartmann J-U, Gerloff D, **Katzerke C**, Falzacappa MV, Pellicci PG, Mueller-Tidow C, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G (2011). PML/RAR alpha -Regulated MicroRNA 181b Targets the Tumor Suppressor RASSF1A in Acute Promyelocytic Leukemia. *Blood*. 2011;118(21):597-598.
- Gerloff D, Braeuer-Hartmann D, **Katzerke C**, Hartmann J-U, Mueller-Tidow C, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G (2011). FLT3-ITD Signaling Induces Oncogenic Mir-155 by NF-kappa B and STAT5 Pathways in Acute Myeloid Leukemia Thereby Targeting Transcription Factor PU.1. *Blood*. 2011;118(21):1481-1481.

Vortrag bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) in Stuttgart, Deutschland, Oktober 2012

- Gerloff D, Grundler R, Braeuer-Hartmann D, **Katzerke C**, Hartmann J-U, Mueller-Tidow C, Duyster J, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G (2012). FLT3-ITD signaling induces oncogenic miR-155 by NF-kappa B and STAT5 pathways in acute myeloid leukemia thereby targeting transcription factor PU.1. *Onkologie*. 2012;35(6):90-90.

Poster bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) in Stuttgart, Deutschland, Oktober 2012

- **Katzerke C**, Madan V, Gerloff D, Braeuer-Hartmann D, Hartmann J-U, Mueller-Tidow C, Schnittger S, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G (2012). Transcription factor C/EBP alpha-induced microRNA miR-30c inactivates Notch1 during granulopoiesis and is downregulated in acute myeloid leukemia. *Onkologie*. 2012;35(6):116-116.
- Hartmann J-U, Braeuer-Hartmann D, Schoedel C, Gerloff D, **Katzerke C**, Mueller-Tidow C, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G (2012). MicroRNA-143 interferes with ERK signaling in granulopoiesis of CD34+hematopoietic progenitor cells and is downregulated in AML. *Onkologie*.2012;35(6):115-116.
- Braeuer-Hartmann D, Hartmann J-U, Gerloff D, **Katzerke C**, Falzacappa MV, Pellicci PG, Mueller-Tidow C, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G (2012). PML/RAR alpha -regulated microRNA 181b targets the tumor suppressor RASSF1A in acute promyelocytic leukemia. *Onkologie*. 2012;35(6):119-120.

Poster beim 54th Annual Meeting of the American Society of Hematology (ASH) in Atlanta, Georgia, USA, Dezember 2012

- **Katzerke C**, Madan V, Gerloff D, Braeuer-Hartmann D, Hartmann J-U, Wurm AA, Mueller-Tidow C, Schnittger S, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G (2012). C/EBP α -Induced Microrna-30c Directly Targets Notch1 during Granulopoiesis and Is Repressed in Acute Myeloid Leukemia. *Blood* 2012;120(21):-.
- Gerloff D, Grundler R, Braeuer-Hartmann D, **Katzerke C**, Hartmann J-U, Mueller-Tidow C, Duyster J, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G (2012). STAT5 and NF- κ B Induced Oncogenic Mir-155 Directly Targets PU.1 in FLT3-ITD Associated AML. *Blood*.2012;120(21):-.
- Hartmann J-U, Braeuer-Hartmann D, Schödel C, Gerloff D, **Katzerke C**, Müller-Tidow C, Tenen DG, Niederwieser D, Gerhard Behre G (2012). Microrna-143 Blocks ERK5 Signaling During Granulocytic Differentiation of Hematopoietic Stem Cells and Is Downregulated in AML. *Blood* 2012;120(21):-.

Poster beim 55th Annual Meeting of the American Society of Hematology (ASH) in New Orleans, Louisiana, USA, Dezember 2013

- Namasu C, Gerloff D, Wurm AA, Braeuer-Hartmann D, J-U Hartmann, **Katzerke C**, Schwind S, Hilger N, Fricke S, Niederwieser D, Behre G (2013). ABR, a Novel Inducer Of Transcription Factor C/EBP α , Is Necessary For Myeloid Differentiation and a Prognostic Factor In Acute Myeloid Leukemia. Blood 2013; 122(21):3814-3814.

Vortrag bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) in Stuttgart, Deutschland, Oktober 2014

- **Katzerke C**, Madan V, Gerloff D, Braeuer-Hartmann D, Hartmann J-U, Wurm AA, Mueller-Tidow C, Schnittger S, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G (2014). Transcription factor C/EBP α -induced microRNA-30c inactivates Notch1 during granulopoiesis and is downregulated in acute myeloid leukemia. Onkologie 2014
- Gerloff D, Grundler R, Braeuer-Hartmann D, **Katzerke C**, Hartmann J-U, Mueller-Tidow C, Duyster J, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G (2014). Das NF- κ B/STAT5/miR-155 Netzwerk reprimiert PU.1 in der FLT3-ITD assoziierten akuten myeloischen Leukämie / NF- κ B/STAT5/miR-155 network targets PU.1 in FLT3-ITD driven acute myeloid leukemia. Onkologie. 2014.

Vortrag beim 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology (ASH) in San Francisco, California, USA, Dezember 2014

- Wurm AA, Gerloff D, Braeuer-Hartmann D, **Katzerke C**, Hartmann J-U, Fricke S, Hilger N, Alberich-Jorda M, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G (2014). C/EBP α and MiR-182 Generate a Negative Feedback Loop Which Is Dysregulated in Acute Myeloid Leukemia. Blood 2014

Poster beim 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology (ASH) in San Francisco, California, USA, Dezember 2014

- Hartmann J-U, Braeuer-Hartmann D, Gerloff D, **Katzerke C**, Wurm AA, Müller-Tidow C, Schwind S, Tenen DG, Niederwieser D, Gerhard Behre G (2014). The G-CSF Induced MiR-143 Targets MAPK-Family Proteins and Is a Prognostic Factor for RIC-Transplanted AML Patients. Blood 2014
- Braeuer-Hartmann D, Hartmann J-U, Gerloff D, **Katzerke C**, Wurm AA, Falzacappa MV, Pellicci PG, Mueller-Tidow C, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G (2014). The PML/RAR α -Regulated MiR-181a/b-Cluster Targets the Tumor Suppressor RASSF1A in Acute Promyelocytic Leukemia. Blood 2014
- Schoedel C, Hartmann J-U, Gerloff D, Braeuer-Hartmann D, **Katzerke C**, Wurm AA, Müller-Tidow C, Tenen DG, Niederwieser D, Gerhard Behre G (2014). PML-RAR α Repressed Microrna 126 Mediates Differentiation in Acute Promyelocytic Leukemia By Targeting the Protooncogene C-Myb. Blood 2014