Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin III
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. H. Döhner

Relevanz deregulierter miR-181a Expression bei der akuten myeloischen Leukämie ohne nachweisbare zytogenetische Veränderungen

Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der
Universität Ulm

vorgelegt von
Katharina Maria Lang
geboren in Schwäbisch Gmünd

2011

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Lars Bullinger
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Thomas Barth
Tag der Promotion:	13.01.2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis..... III - IX

1. Einleitung..... 1

1.1 Akute myeloische Leukämie (AML) 1

1.1.1 Definition 1
1.1.2 Epidemiologie der AML 1
1.1.3 Ätiologie und Pathogenese der AML 1
1.1.4 Klinisches Bild der AML 2
1.1.5 Diagnose und Klassifikation der AML 2
1.1.6 Therapie der AML 5
1.1.7 Prognose und Risikostratifizierung der AML 6
1.1.8 Die Rolle deregulierter Genexpression bei der AML 9

1.2 microRNAs (miRNAs) in Tumorerkrankungen und Leukämien 11

1.2.1 Biogenese und Funktionsweise der microRNAs 11
1.2.2 microRNA in Neoplasien 13
1.2.3 microRNA als Tumorsuppressor 14
1.2.4 microRNA als Onkogen 14
1.2.5 Deregulierte microRNA Expression in der AML 15

1.3 Zielsetzung der Arbeit..... 18

2. Material und Methodik..... 19

2.1 Patientenproben 19
2.1.1 Therapie im Rahmen der AMLSG HD98A- und 07-04-Studien 21
2.2 RNA-Isolation mittels Trizol® 23
2.2.1 Kontrolle der RNA-Qualität 24
2.3 RNA-Isolation mittels miRVana® 24
2.4 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) 25
2.4.1 SuperScript III® First Strand Synthesis System für die qRT-PCR 25
2.4.2 TaqMan® MicroRNA Assay 26
2.5 quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) 27
2.5.1 SYBRGreen I® 27
2.5.2 TaqMan® 28
2.5.3 Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse (Normalisierung) 30
2.5.4 Statistische Auswertung 30
2.6 miR-181a: Identifizierung potentieller Zielgene 30
2.7 Primerdesign für potentielle miR-181a Zielgene 31
2.8 Zellkultur und Zelllinien 32
2.9 Zelltransfektion (Nukleofektion mittels AMAXA-Nucleofector) 33
2.10 Durchflusszytometrische Analysen und Zellzählung 34
2.10.1 Zellzählung 34
2.10.2 Messung am Durchflusszytometer 34

2.10.3 Färbung mit Annexin V + 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) 34
2.11 Reagenzien und Chemikalien 35
3. Ergebnisse…….. 37
3.1 Ergebnisse aus Vorarbeiten 37
3.2 Ergebnisse der Messung der AMLSG HD98A Studienfälle (n=83) 39
3.2.1 qRT-PCR Messungen 39
3.2.2 Korrelation der miR-181a Expression mit dem Gesamtüberleben bzw. dem ereignisfreien Überleben der AMLSG HD98A-Studienfälle 41
3.2.3 Korrelation der miR-181a Expression mit dem Genmutationsstatus der AMLSG HD98A-Studienfälle 43
3.3 Ergebnisse der Messung der AMLSG 07-04 Studienfälle (n=48) 45
3.3.1 qRT-PCR Messungen 45
3.3.2 Korrelation der miR-181a Expression mit dem Genmutationsstatus der AMLSG 07-04-Studienfälle 47
3.4 Evaluation der miR-181a Überexpression im Zelllinienmodell 48
3.4.1 Überexpression der pre-miR-181a in den Leukämiezelllinen HEL und K562 mittels Transfektion durch Elektroporation 48
3.4.2 Effizienz der Transfektion 48
3.5 Zellzählung zur Überprüfung der Auswirkung der miR-181a Überexpression auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien 50
3.6 Durchflusszytometrische Analysen der Auswirkung der miR-181a Überexpression auf das Apoptoseverhalten der Zelllinien 52
3.7 Korrelation der miR-181a Expression mit vorhandenen Genexpressionsdaten zur Identifizierung hypothetischer Zielgene 55
3.8 qRT-PCR Analyse der Auswirkung einer miR-181a Überexpression auf die potentiellen Zielgene 56
4. Diskussion…….. 60
4.1 Diskussion der qRT-PCR Messungen der Patientenproben 60
4.1.1 Diskussion der Methodik 60
4.1.2 Diskussion der Ergebnisse der Messung im HD98A Patientenkollektiv 60
4.1.3 Diskussion der Ergebnisse der Messung im 07-04-Patientenkollektiv 62
4.2 Diskussion der Zelllinenexperimente 63
4.2.1 Diskussion der Methodik 63
4.3 Diskussion des beobachteten Phänotyps 64
4.3.1 Diskussion der Ergebnisse der Zellzählung 64
4.3.2 Diskussion der Ergebnisse des Apoptose-Assays 67
4.3.3 Diskussion der qRT-PCR Ergebnisse zu den potentiellen Kandidatengenen 68
5. Zusammenfassung…….. 72
6. Literaturverzeichnis…….. 74

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin (interkalierender Farbstoff)
A	Adenosin
A-	Adenin
A-	all-trans-Retinolsäure (im Therapieschema der AMLSG)
A1 / A2	Anregungsspektrum des „reporter“ / „quencher“
abn	Abnormalität
ACTB	Aktin, beta
Ago2	Argonaute 2 Protein
AIDA	all-trans-Retinolsäure und Idarubicin
AKT3	„v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma)“
ALL	akute lymphatische Leukämie
alloBSCT	allogene Blutstammzelltransplantation
AML	akute myeloische Leukämie
AMLSG	AML Studiengruppe
APP	„amyloid beta (A4) precursor protein“
APL	akute Promyelozytenleukämie
AraC	Cytosin-Arabinosid
ASXL1	„additional sex combs like 1“
ATM	„ataxia telangiectasia mutated“
ATP	Adenosintriphosphat
ATRA	all-trans Retinsäure
autoBSCT	autologe Blutstammzelltransplantation
[b]	Basen
BAALC	“brain and acute leukemia, cytoplasmic”
Bcl2	„B-cell CLL/lymphoma 2“
Bcl2L11	„Bcl2-like 11 (apoptosis facilitator)“
Bcl6	„B-cell CLL/lymphoma 6“
BCR/ABL1	„breakpoint cluster region“ / „c-abl oncogene 1“
BIC	„bicaudal“
Bim	= Bcl2L11 = “Bcl2-like 11”

BMPR2	“bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)”
BSCT	Blutstammzelltransplantation
C	Cytosin
C-	Cytarabin (im Therapieschema der AMLSG)
CBF	„core binding factor“
CBFB	„core binding factor beta“
CBL	„cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence“
CCNE2	„cyclin E2“
CD	„cluster of differentiation“ (Differenzierungsantigen) z.B. CD33
CDC42	”cell division cycle 42 (GTP binding protein)”
CDC42BPA	”CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)”
CDK4	„cyclin-dependent kinase 4“
CDKN1A	“cyclin-dependent kinase inhibitor 1A”
cDNA	komplementäre DNA
CDX2	„caudal type homeobox 2“
CEBPA/B	„CCAAT/enhancer binding protein alpha/beta“
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CML	chronisch myeloische Leukämie
CN-AML	AML mit normalem Karyotyp
CR	komplette Remission (complete remission)
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor
DEK	„DEK oncogene“
Del	Deletion
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFS	erkrankungsfreies Überleben (disease free survival)
DMPK	„dystrophia myotonica-protein kinase“
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNMT3A/B	DNA (cytosine-5-) methyltransferase 3 alpha/beta
dNTP	Desoxyribonuleosidtriphosphate
dsRBD-DGCR8	Doppelstrang-RNA bindendes Protein-DiGeorge

	syndrome critical region gene 8
DTT	Dithiothreitol
DUSP5	„dual specificity phosphatase 5“
E1 / E2	Emissionsspektrum des „reporter“ / „quencher“
E2F1/2/3	E2F transcription factor 1/2/3
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFS	ereignisfreies Überleben (event-free survival)
ERG	„v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog“
ETS	„E26 transformation specific transcription factor“
EVI1	„ecotropic viral integration site 1“
FAB	French America British
FBS	fetales bovines Serum
FLT3	„fms-related tyrosine kinase 3“
FOXP3	„forkhead box P3“
FRET	Fluoreszenzresonanz-Energietransfer
G-	Guanin
G / l	Giga / l
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GEP	Gene expression profiling
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GFI1	“growth factor independent 1 transcription repressor”
GTP	Guanosintriphosphat
HAM	hochdosiert Cytosin-Arabinosid und Mitoxantrone
HEL	humane Erythroleukämiezelllinie
HL-60	akute promyeloische Leukämiezelllinie
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HMGA2	“high motility group AT-hook 2”
HOX	„homeobox gene“
HSZ	humane / hämatopoetische Stammzellen
ICE	Idarubicin, Cytosin-Arabinosid und Etoposid
ID	Patientenidentifikationsnummer
ID1	„inhibitor of DNA-binding 1“
IDH1/2	„isocitrate dehydrogenase 1/2“

IGF1	“Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)”
IGF1R	“Insulin-like growth factor 1 receptor”
INPP5D	„Inositol polyphosphatase-5-phosphatase“
inv	Inversion
IRS2	„Insulin receptor substrate 2“
ITD	interne Tandemduplikation
JAK2	„Janus kinase 2“
K562	Zelllinie einer humanen CML in der Blastenkrise
KIT	„v-kit Hardy Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog“
KM	Knochenmark
KRAS	„v-Ki-ras 2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog“
LDH	Laktatdehydrogenase
LMNB1	„lamin B1“
LP	Liquorpunktion
MAP	„mitogen-activated protein“
MAP3K7IP2	„mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 2“
MAPK	„MAP-kinase“
MCL1	„myeloid cell leukemia sequence 1“
M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
ME-I	humane AML-Zelllinie
MECOM	“MDS1 and EVI1 complex locus”
MGppG-Cap	7-Methyl-Guanosin-5’-Triphosphat-5’-Guanosin-Cap
microRNA	miRNA = miR = microRibonukleinsäure
MKL1	„megakaryoblastic leukemia“-Translokation 1
MKP	“dual-specificity MAP-kinase phosphatase”
MLL	“myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia”
MLL-AF9	“myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia” / “myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia”-Translokation 3 - Fusionsgen
MLLT3	“myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia”-

	Translokation 3
MM	Multiples Myelom
MN1	„meningeoma 1“
MRCKα	= CDC42BPA
MRD	minimal rest disease
mRNA	messenger RNA (Boten RNA)
mTORC1	“mammalian target of rapamycin complex 1”
MUD	matched-unrelated donor
MYB	„v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog“
MYC	„v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog“
MYH11	„myosin, heavy chain 11“
n	Anzahl
negctr	Negativkontrolle
NFκB	nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer”
NGS	next-generation sequencing
NLR	„nucleotide-binding domaine and leucine-rich repeat containing“-family
nontfx	nicht transfiziert
NPM1	„nucleophosmin 1“
NRAS	“neuroblastoma v-ras oncogene homolog”
NTP	Nukleotidtriphosphat
NUP214	„nucleoporin 214kDalton“
ORF	open reading frame
OS	Gesamtüberleben (overall survival)
p53 / 27	Tumorsupressorproteine
PACT	„protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator“
PB	peripheres Blut
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGK1	„phosphoglceratkinase 1“
PI3K	„phosphoinositide - 3 – kinase“
PLAG1	„pleiomorphic adenoma gene 1“

PLA2G4A	“phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)”
PML	Promyelozytenleukämie
PML-RARA	„promyelocytic leukemia“ / „retinoic acid receptor alpha“-Fusionsgen
Pol II	RNA-Polymerase II
Poly-A	Poly-Adenosin
PPIA	„cyclophilin A (peptidylprolylisomerase A)“
PR	Partielle Remission
pre-miR	precursor-microRNA
pri-miR	primary-microRNA
PTD	partielle Tandemduplikation
PTEN	„phosphatase and tensin homolog“
Q	„quencher“-Fluoreszenzfarbstoff
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion
Qty mean	mittlere Quantität
R	randomisierte Zuordnung
R’	„reporter“-Fluoreszenzfarbstoff
RAN-GTP	Ran-Guanosintriphosphat
RARA	„retinoic acid receptor alpha“
RAS	„ras-oncogene“
RASSF2	„Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 2“
RBM15	„RNA-binding motif protein 15“
RD	rest disease
RFS	rezidivfreies Überleben
RISC	„RNA-induced silencing complex“
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Zellkulturmedium
RPN1	„ribophorin 1“
RPN1RT	„ribophorin 1“-Reverse Transkriptase
RTK	Rezeptortyrosinkinasen

RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
RUNX1	„runt-related transcription factor 1“
RUNX1T1	„runt-related transcription factor 1“-Translokation 1
SAM	Significance Analysis of Microarrays
SCF	Stammzellfaktor (stem cell factor)
SCHIP1	„Schwannomin interacting protein 1“
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SP1	„SP1 transcription factor“
SSC	Standard Sodium Citrat
SSC-	Streulicht beim Durchflusszytometer
t	Translokation
T-	Thymin
TAE	TrisAcetatEDTA
Taq	Taq-Polymerase
TCL1	„T-cell leukemia/lymphoma 1“
TET2	„tet oncogene family number 2“
tfx	transfiziert
TF	Transkriptionsfaktor
TGF-β	„transforming growth factor beta“
TKD	Tyrosinkinasedomäne
TLR2	„toll-like receptor 2“
Tp53	Tumorprotein 53
Tpl	Transplantation
TRBP	TAR RNA binding protein
UTR	untranslated region
UV	Ultraviolett
VPA	Valproinsäure
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
WT	Wildtyp (unmutiert)
WT1	„Wilms tumor 1“
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämie (AML)

1.1.1 Definition

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist definiert als maligne Entartung des myeloischen Anteils des hämatopoetischen Systems, die zur klonalen Expansion myeloischer Blasten im Knochenmark und Blut führt. Die entarteten myeloischen Vorläuferzellen sind dabei in ihren normalen Zellfunktionen, wie Zellerneuerung und Differenzierung gestört sowie von physiologischen Wachstumsregulatoren entkoppelt. Darüber hinaus ist der normale Ablauf der Hämatopoese gestört, was zu veränderten Zellzahlen und Zellfunktionen der Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten und Granulozyten führt.

1.1.2 Epidemiologie der AML

Die AML ist mit ca 80% aller akuten Leukämien die häufigste akute Leukämie im Erwachsenenalter. Ihre Prävalenz steigt mit zunehmendem Lebensalter an. In Deutschland erkranken jährlich ungefähr 3 pro 100.000 Menschen, dabei liegt das mediane Erkrankungsalter bei 70 Jahren. Das Geschlechterverhältnis ist nahezu ausgeglichen.

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese der AML

Bisher bekannte Risikofaktoren für die Entwicklung einer AML sind Knochenmarksschädigungen, die durch ionisierende Strahlung oder vorangegangene Zytostatika-Therapien hervorgerufen werden können. Auch chronische Benzol-Exposition, am häufigsten durch Zigarettenrauchen, erhöht das Risiko an einer AML zu erkranken (Kane et al. 1999). Zudem zeigt sich eine erhöhte AML-Inzidenz im Zusammenhang mit vererblichen Syndromen mit chromosomaler Aneuploidie, wie beim Down-Syndrom oder dem Klinefelter-Syndrom. Eine eindeutige Zuordnung der Erkrankungsfälle zu den vorangegangenen Faktoren ist aber nur selten möglich (Russell 1997).

Bezüglich der Entwicklung einer AML wird heute angenommen, dass es sich um eine Mehrschritt-Pathogenese handelt. Für die Entstehung eines AML-Blasten aus

normalen hämatopoetischen Zellen werden mindestens zwei unterschiedliche Aberrationen benötigt, die zum malignen Phänotyp beitragen (Gilliland u. Griffin 2002). Zum einen gibt es sog. Klasse I-Mutationen, die einen proliferativen Vorteil der Zellen bewirken und häufig Zelloberflächenrezeptoren wie Tyrosinkinaserezeptoren (z.B. *FLT3*) oder Onkogene wie *NRAS* oder *KRAS* betreffen. Dadurch kommt es zu einer dauerhaften Aktivierung der genannten Signalwege, die über verschiedene Wege zur klonalen Expansion der betroffenen hämatopoetischen Progenitorzelle führen können. Sog. Klasse II-Mutationen wie z.B. *HOX*-Gen-Überexpression bzw. die Entstehung von *HOX*-Fusiongenen im Rahmen von Translokationen, beeinflussen hingegen maßgeblich die Differenzierung der betroffenen hämatopoetischen Progenitorzellen, so dass diese nicht mehr ausreifen können. Zur Entwicklung einer AML werden Schäden aus beiden Mutationsklassen benötigt, Schäden in einer Klasse allein führen zu keiner AML-Entstehung (Fröhling et al. 2005). Durch das Zusammenwirken beider Mutationen kommt es zur Anhäufung unreifer Vorläuferzellen, die einerseits stärker proliferieren, andererseits jedoch unfähig sind zu funktionsfähigen, reifen Zellen zu differenzieren.

1.1.4 Klinisches Bild der AML

Patienten mit AML zeigen ein sehr heterogenes Beschwerdebild (Byrd et al. 2002), meist mit sehr unspezifischen Symptomen, wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit und Schwäche. Die gestörte Hämatopoese kann eine Anämie mit Blässe, Dyspnoe und Müdigkeit, eine Thrombozytopenie mit Blutungsneigung und Hämatomanfälligkeit, sowie eine Granulozytopenie mit gesteigerter Infektanfälligkeit zur Folge haben. Neben der direkt auf den Funtkionsausfall der einzelnen Zellreihen beruhenden Symptomatik, kann es selten auch zu einem extramedullären Befall kommen, welcher sich in einer Spleno- oder Hepatomegalie sowie Haut- oder ZNS-Infiltrationen manifestiert (Löwenberg et al. 1999). Eine unbehandelte AML führt rasch infolge unbeherrschbarer Infektionen oder Blutungen zum Tode.

1.1.5 Diagnose und Klassifikation der AML

Die Diagnose einer AML wird durch Blutbild- und Knochenmarkbefunde gestellt. Dabei müssen mindestens 20 % myeloische Blasten im Blut bzw. im Knochenmark vorhanden sein. Neben der Zytomorphologie der Blasten können auch histochemische Färbungen mit Myeloperoxidase und Esterase bei der

Diagnosestellung zum Einsatz kommen. Die Einteilung der AML in biologische Subgruppen bezieht darüber hinaus zytogenetische, immunologische und molekulargenetische Methoden mit ein.

Seit 1976 erfolgte die Einteilung allein aufgrund Zytomorphologie, Zytochemie und Immunphänotypisierung gemäß der FAB-(French-American-British)-Klassifikation (Bennett et al. 1976). Dabei werden 8 Subtypen von M0 bis M7 unterschieden. Die darauf folgende WHO-Klassifikation umfasst seit 2000 zusätzlich zur Zytomorphologie, Zytochemie und Immunphänotypisierung auch zytogenetische und klinische Merkmale, deren Bedeutung für das Therapieansprechen und die Prognose einen zunehmenden Stellenwert gewinnen.

Nach einer Revision der bestehenden WHO-Klassifikation 2008 werden nun zusätzlich spezifische Genmutationsexpressionsmuster zur Einteilung der AML herangezogen (Vardiman et al. 2009). Dabei werden Veränderungen in Genen, wie *FLT3*, *NPM1* oder *CEBPA,* einbezogen, so dass in dieser neuen Klassifikation auch solche AML-Fälle mit normalem Karyotyp, also ohne Veränderungen der Zytogenetik, erfasst werden können (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Aktuelle WHO-Klassifikation der AML

(modifiziert nach Vardiman et al. 2009)

Abkürzungen:

WHO = Weltgesundheitsorganisation; AML = akute myeloische Leukämie; t(8;21) / t(15;17) / t(9;11) / t(6;9) / t(1;22) = Translokation (8;21) / (15;17) / (9;11) / (6;9) / (1;22); inv(16) = Inversion 16; *RUNX1* = „runt-related transcription factor 1"; *RUNX1*T1 = „runt-related transcription factor 1"-Translokation 1; *CBFB* = „core binding factor beta"; *MYH11* = „myosin heavy chain 11"; PML = Promyelozytenleukämie; RARA = „retinoic acid receptor alpha"; *MLL*T3 = „mixed lineage leukemia"-Translokation 3; MLL = „mixed lineage leukemia"; *DEK* = „DEK oncogene" ; NUP214 = „nucleoporin 214 kiloDalton"; *RPN1* = „ribophorin 1"; *EVI1* = „ecotropic viral integration site 1"; RBM15 = „RNA binding motif protein 15"; *MKL1* = „megakaryoblastic leukemia (translocation) 1"; *NPM1* = „nucleophosmin 1"; *CEBPA* = „CCAAT/enhancer binding protein alpha"; MDS = Myelodysplastisches Syndrom

AML mit rekurrenten chromosomalen Aberrationen
AML mit t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*
AML mit inv(16)(p13.1q22); *CBFB-MYH11*
APL mit t(15;17)(q22;q12); *PML-RARA*
AML mit t(9;11)(p22;q23); *MLLT3-MLL*
AML mit t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214*
AML mit inv(3)(q21q26.2); *RPN1-EVI1*
AML mit t(1;22)(p13;q13); *RBM15-MKL1*
Provisorische Entität: AML mit mutiertem *NPM1*
Provisorische Entität: AML mit mutiertem *CEBPA*

AML mit multilinearer Dysplasie (2 oder 3 Zelllinien) mit oder ohne vorbestehendem Myelodysplastischen Syndrom (MDS)

Therapie-bedingte AML oder MDS
durch Alkylantien, Bestrahlungen
durch Topoisomerase-II-Inhibitoren
durch Sonstiges

AML, nicht weiter spezifiziert
AML, minimal differenziert
AML, ohne Ausreifung
AML, mit Ausreifung
Akute myelomonozytäre Leukämie
Akute monoblastische und monozytäre Leukämie
Akute erythrozytäre Leukämie
Akute megakaryoblastäre Leukämie
Akute basophile Leukämie
Akute Panmyelose mit Myelofibrose

Myeloisches Sarkom

Myeloische Proliferation beim Down-Syndrom

Blastische plasmazytoide dendritische Zell-Neoplasien

Akute Leukämie mit nicht eindeutiger Linienzugehörigkeit

1.1.6 Therapie der AML

Das Therapieregime wird oft anhand des Patientenalters ausgewählt, wobei ältere Patienten häufig nicht so aggressiv behandelt werden. Üblicherweise ist die Behandlung neu diagnostizierter AML-Patienten in 2 Phasen unterteilt. Die initiale Induktionstherapie, bestehend aus einer Kombinationschemotherapie mit 2 bzw. 3 verschiedenen Substanzen, hat zum Ziel eine komplette Remission (CR) zu induzieren. Dabei wird normalerweise ein Pyrimidinantagonist (z.B. Cytarabinosid) mit einem Anthrazyklin (z.B. Daunorubicin) kombiniert, eventuell unter Zugabe von Etoposid, einem Topoisomerase II-Hemmer. Nach Abschluss der Induktionstherapiephase wird anhand einer Knochenmarkuntersuchung der Therapieerfolg kontrolliert. Bei 65-75% aller Patienten zwischen dem 18. und 60. Lebensjahr kann eine komplette Remission erzielt werden. Bei Patienten, die älter als 60 Jahre sind, kann durch eine angepasste, intensive Induktionstherapie nur in ca 50 % der Fälle eine Remission erreicht werden (Löwenberg et al. 2003). Auch bei den jüngeren Patienten sprechen 25-35% nicht auf die initiale Therapie an.

Die anschließende Postremissionstherapie dient der Vernichtung aller übrig gebliebenen Leukämiezellen. Somit soll ein Rezidiv verhindert und damit die Überlebenszeit verlängert werden. Die Wahl der geeigneten Therapie wird dabei meist anhand der zytogenetischen Risikostratifizierung getroffen. Während bei Patienten mit niedrigem bzw. mittlerem Risikoprofil eine intensivierte Chemotherapie (z.B. mit hochdosiertem Cytarabin) empfohlen wird, ist bei Hochrisiko-Patienten bereits früh eine myeloablative allogene Stammzelltransplantation angeraten.

Neben dieser konventionellen chemotherapeutischen Therapieoption gibt es neuere, alternative Therapien, welche an genetischen bzw. molekularen Aberrationen ansetzen. So kann die akute Promyelozytenleukämie (APL) schon länger erfolgreich mit all-trans-Retinsäure (ATRA) behandelt werden. Dabei wirkt ATRA an einem bei der APL häufig zu findenden Fusionsgen-Produkt, PML-RARA, welches durch die Translokation (15;17) entsteht (Huang et al. 1993).

Durch immer neuere Kenntnisse der Pathophysiologie von Leukämien konnten in den letzten Jahren verschiedene Wirkstoffe entwickelt werden, so zum Beispiel Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Midostaurin, ein FLT3-Inhibitor, der in der Therapie der AML im Rahmen klinischer Studien angewendet wird. Auch Farnesyltransferase-Inhibitoren wie Tipifarnib, demethylierende Substanzen wie Decitabine, Histon-Deacetylase-Inhibitoren wie Valproinsäure, Immunmodulatoren wie Lenalidomid und

monoklonale Antikörper wie Gemtuzumab, ein anti-CD33-Antikörper werden in Kombination mit Chemotherapeutika in klinischen Studien hinsichtlich ihrer Wirksamkeit getestet (Haferlach 2008).
Durch die ständige Weiterentwicklung der Therapien konnte bei Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) bereits eine Heilungsrate von über 80% erreicht werden (Pui et al. 2008), was das Potential dieser neuen Therapieansätze zeigt.

1.1.7 Prognose und Risikostratifizierung der AML

Prognostische Relevanz zeigen klinische Parameter, wie Alter des Patienten, Leukozytenzahl und LDH-Spiegel im peripheren Blut und vorangegangene maligne Erkrankungen oder myelodysplastische Syndrome.
Die wichtigste prognostische Bedeutung kommt jedoch dem Vorliegen chromosomaler Aberrationen zu. Außerdem sind zunehmend verschiedene Genmutationen prognostisch relevant.

Zytogenetische Veränderungen als prognostischer Faktor

Der Karyotyp zum Zeitpunkt der Diagnosestellung stellt den wichtigsten prognostischen Parameter bei AML-Patienten dar (Döhner et al. 2010; Mrozek et al. 2004). Doch nur 55% aller AML-Patienten zeigen bei der Erstdiagnose chromosomale Aberrationen, anhand derer eine Einteilung in Risikogruppen erfolgen kann. Der „niedrig-Risiko“-Gruppe mit guter prognostischer Voraussage werden unter anderem Translokationen wie t(8;21) oder t(15;17), sowie Inversion und/oder Translokation inv(16)/t(16;16) zugeordnet. Zur Gruppe mit mittlerem Risikoprofil gehören alle Patienten mit unauffälligem, d.h. zytogenetisch normalem Karyotyp (CN-AML) in der konventionellen Chromosomenbänderungsanalyse. Der „hoch-Risiko“-Gruppe mit schlechter Prognose werden komplexe Karyotypen zugeordnet. Zu diesen zählt das Vorliegen von mindestens 3 chromosomalen Aberrationen, ohne prognotisch günstige Veränderungen, wie z.B. der Verlust von Chromosom 5(q) oder 7(q) (Mrozek et al. 2001, Byrd et al. 2002).

Molekulargenetische Veränderungen als prognostischer Faktor

Als weiterer prognostischer Marker wurden in den letzten Jahren mit zunehmender Bedeutung Genmutationen und veränderte Genexpressionsmuster beschrieben. Diese sind vor allem bei den 45% der AML-Patienten von prognostischer Relevanz,

die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung einen zytogenetisch normalen Karyotypen aufweisen, sog. CN-AML-Fälle, und somit nicht anhand chromosomaler Aberrationen in Risikoprofile stratifiziert werden können (Mrozek et al. 2007).

Die Mutationen finden sich vorwiegend in Hämatopoese-assoziierten Genen. Häufig betroffen ist das „fms-related Tyrosinkinase 3“ (*FLT3*)-Gen, das einen hämatopoetischen Wachstumsfaktor-Rezeptor kodiert. Interne Tandemduplikationen (ITDs), die vor allem in der juxtamembranären Domäne des Rezeptors auftreten, zeigen sich bei 28-34% aller AML-Fälle mit normalem Karyotyp (CN-AML). Dadurch ist die Autoinhibierung der Tyrosinkinase gestört. *FLT3*-ITDs zeigen eine schlechte Prognose in Bezug auf das Erzielen einer kompletten Remission und der Gesamtüberlebenszeit (Fröhling et al 2002, Schlenk et al. 2008). Bei 45-64% aller CN-AML-Fälle zeigt sich eine Mutation im „nucleophosmin 1“ (*NPM1*)-Gen, das ein Phosphoprotein kodiert, welches wiederum Einfluss auf die Stabilität und Aktivität von p53 nimmt. Alleinige *NPM1*-Mutationen ohne *FLT3*-ITD zeigen eine gute Prognose (Schlenk et al. 2008). *NPM1*-Mutationen mit gleichzeitig vorliegender *FLT3*-ITD-Mutation zeigen 40% aller AML-Fälle und diese weisen eine schlechte Prognose auf. Eine weitere Mutation kann das „CCAAT/enhancer binding protein alpha“ (*CEBPA*)-Gen betreffen, das einen wichtigen Transkriptionsfaktor in der Hämatopoese kodiert. Die Inzidenz liegt bei 10-18% aller CN-AML-Fälle und das Vorliegen einer *CEBPA*-Mutation ist mit einer guten Prognose assoziiert. Hier konnte vor kurzem jedoch gezeigt werden, dass nur CN-AML-Fälle, in denen beide Allele des *CEBPA*-Gens betroffen sind, eine distinkte Biologie aufweisen und prognostisch günstig verlaufen (Wouters et al. 2009b).

Die CN-AML-Patienten mit einer partielle Tandemduplikation (PTD) im „mixed-lineage leukemia“ (*MLL*)-Gen, machen 5-11% der Erkrankten aus und haben eine schlechtere Prognose. In den letzten Jahren wurden viele weitere nennenswerte Mutationen identifiziert, darunter solche, die beispielsweise das *NRAS*-Gen, *WT1*-Gen oder das *RUNX1*-Gen betreffen (Döhner et al. 2010).

Der heutige Stand der Forschung geht bei der Entstehung der AML von einer Mehrschritt-Pathogenese aus. Durch Mutationen aus zwei verschiedenen Mutationsklassen kommt es zur Akkumulation von stark proliferierenden, nicht differenzierungsfähigen Blasten.

Ein Teil der dafür relevanten Mutationen ist in Tabelle 2 aufgeführt (Bullinger et al. 2010; Döhner u. Döhner 2008; Bullinger u. Döhner 2010).

Tabelle 2: Biologische und klinische Parameter assoziiert mit Genmutationen bei der AML (modifiziert nach Döhner u. Döhner 2008)

Abkürzungen:

AML = akute myeloische Leukämie; *NPM1* ="nucleophosmin 1"; *FLT3* = „fms-related tyrosinkinase 3"; ITD = „internal tandem duplication"; TKD = Tyrosinkinasedomäne; RFS = rezidivfreies Überleben; OS = Gesamtüberleben; EFS = ereignisfreies Überleben; *CEBPA* = „CCAAT/enhancer binding protein alpha"; CN-AML = AML mit normalem Karyotyp; CR = komplette Remission; *MLL* = „mixed lineage leukemia"; PTD = partielle Tandemduolikation; *NRAS* = „neuroblastoma RAS viral oncogene homolog"; *KRAS* = „v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog"; CBF = „core-binding-factor"; *KIT* = „v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog"; *WT1* = „Wilms tumor 1"; *RUNX1* = „runt-related transcription factor 1"; *IDH1* = „isocitrate dehydrogenase 1"; *IDH2* = „isocitrate dehydrogenase 2"; *TET2* = „tet oncogene family number 2"; *ASXL1* = „additional sex combs like 1"; *JAK2* = „Janus kinase 2"; *CBL* = „Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence"; *TP53* = Tumorprotein 53

Gen	Biologische Parameter	Klinische Parameter
NPM1	kodiert ein Phosphoprotein mit pleiotropen Funktionen; bei Erwachsenen in 25-35% der AML-Fälle mutiert; mit *FLT3*-ITD- und *FLT3*-TKD-Mutationen assoziiert	Genotyp "*NPM1*-Mutation ohne *FLT3*-ITD-Mutation" mit günstigem RFS und OS assoziiert
CEBPA	Hauptregulatorischer Transkriptionsfaktor der Hämatopoese; In 10-18% der CN-AML-Fälle mutiert	Mutationen mit verbesserter CR und günstigererem RFS und OS assoziiert
FLT3	Klasse III-Rezeptor-Tyrosinkinase; spielt eine wichtige Rolle bei Proliferation, Überleben und Differenzierung hämatopoetischer Zellen	
ITD	In ca. 20% aller AML-Fälle zu finden	mit schlechterer Prognose bei CN-AML-Fällen assoziiert
TKD	Punktmutationen in der Tyrosinkinase-Domäne in 5-10%	prognostische Signifikanz kontrovers diskutiert
MLL	DNA-bindendes Protein, das Genexpression bei der Hämatopoese reguliert; *MLL*-PTD in 5-11% aller CN-AML-Fälle zu finden	mit kürzerer CR-Dauer und schlechterem RFS und EFS assoziiert
NRAS	Membran-assoziiertes Protein, das Proliferation, Differenzierung und Apoptose reguliert; Mutationen in 9-14% aller CN-AML-Fälle zu finden	mutiertes NRAS vermittelt Cytarabine-Sensitivität
KRAS	Siehe *NRAS*; Mutationen in 5-17% aller CBF-AML-Fälle zu finden	bisher wurde keine prognostische Signifikanz nachgewiesen
KIT	Klasse III-Rezeptor-Tyrosinkinase; spielt eine Schlüsselrolle in Überleben, Proliferation, Differenzierung und funktioneller Aktivierung von hämatopoetischen Progenitorzellen; Mutationen in ca 30% der CBF-AML-Fälle zu finden	Mutationen, vor allem im Exon 17 sind in vielen, jedoch nicht allen Studien mit schlechter Prognose assoziiert
WT1	Transkriptionsfaktor, der in der Regulation von Apoptose, Proliferation und Differenzierung eine Rolle spielt; Mutationen sind in ca 10% aller CN-AML-Fälle zu finden	erste Studien zeigen eine Assoziation mit einem Versagen der Induktionstherapie, die prognostische Bedeutung wird gegenwärtig untersucht
RUNX1	Transkritionsfaktor, der in der normalen hämatopoetischen Differenzierung eine Rolle spielt; Mutationen in 10-13% aller CN-AML-Fälle zu finden	mit schlechterer CR-Rate und kürzerem EFS und OS assoziiert; unabhängiger ungünstiger Prognosefaktor für OS
IDH1/IDH2	Isocitrat-Dehydrogenase; in ca 16% aller CN-AML-Fälle zu finden; Mutationen führen zu einer übermäßigen Anhäufung von R(2)-2-Hydroxyglutarat (2HG)	noch keine Aussage möglich
TET2	der tet-Familie zugehörig; katalysiert evtl. die Konversion von Methyl-Cytosin (5mc) zu 5-Hydroxymethylcytosin (hmc); Mutationen in 12-17% aller AML-Fälle zu finden	wahrscheinlich ungünstiger prognostischer Einfluß in *NPM1*-mutierten Fällen
ASXL1	ein Protein der Polycomb-Gruppe; Beteiligung an der epigenetischen Regulation	noch keine Aussage möglich
JAK2	Protein-Tyrosinkinase; Mutationen häufig bei myeloproliferativen Erkrankungen, jedoch selten bei AML	bislang wurde keine prognostische Signifikanz gefunden
CBL	Adaptorprotein für Rezeptorprotein-Tyrosinkinasen; in ca 1-5% aller AML-Fälle; mit CBF-AML assoziiert	noch keine Aussage möglich
TP53	Tumorprotein 53, als Reaktion auf verschiedenen zellulären Stress; Mutationen in 56-78% aller AML-Fälle mit komplexem Karyotyp	mit schlechter Prognose assoziiert

1.1.8 Die Rolle deregulierter Genexpression bei der AML

Neben zytogenetischer und molekularer Aberrationen, die durch „Gene Expression Profiling (GEP)“, d.h. Genexpressionsprofilanalysen, detektiert werden können, geben auch veränderte Genexpressionsmuster einen Einblick auf, der Leukämogenese zugrunde liegende, molekulare Mechanismen. Die Information über veränderte Genexpression trägt so zur Verbesserung der molekularen Klassifikation der AML bei und stellt einen prognostischen Faktor dar, der unabhängig von bekannten genetischen Risikofaktoren ist (Bullinger 2006, Wouters et al. 2009a).

So konnte zum Beispiel in einer Subgruppe der AML mit komplexem Karyotyp, die eine schlechte Prognose aufweist, eine Amplifikation des ETS-Transkriptionsfaktors *ERG* festgestellt werden, die eine *ERG*-Überexpression bedingt. Dereguliertes *ERG* könnte somit eine Bedeutung bei der Leukämogenese haben und auch den Erfolg der AML-Therapie beeinflussen, indem es Zelldifferenzierung und –proliferation reguliert und fördert (Mrozek et al. 2007). Jedoch ist eine *ERG*-Überexpression nicht nur bei einer Genomamplifikation zu finden, sondern auch in AML-Fällen mit normalem Karyotyp (Baldus et al. 2004). In diesen AML-Fällen mit normalem Karyotyp war eine *ERG*-Überexpression signifikant mit einer schlechten Prognose assoziiert (Marcucci et al. 2005, Marcucci et al. 2007, Metzeler et al. 2009). Neben *ERG* konnte auch für weitere transkriptionell deregulierte Gene eine Assoziation mit einer schlechten Prognose und ein Einfluß bei der Entstehung einer CN-AML gezeigt werden. So zum Beispiel eine Überexpression von *BAALC* (Baldus et al. 2003, Langer et al. 2008) oder *MN1*, ein Onkogen, dessen Überexpression in Mäusen rasch zur Entwicklung einer AML führt (Heuser et al. 2006, Heuser et al. 2007, Langer et al. 2009). Auch ein hoher Expressionslevel von *MECOM* (MDS 1 und EVI1 complex locus) ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al. 2003, Lugthart et al. 2008).

Die deregulierte Expression von *CDX2*, einem Regulator der *HOX*-Genexpression, und von *ID1*, das nachgeordnet von Onkogen-Tyrosinkinasen beeinflusst wird, sind ebenfalls mit dem potentiellen Entstehen einer Leukämie in Zellen assoziiert (Scholl et al. 2007, Rawat et al. 2008; Tam et al. 2008, Suh et al. 2009, Tang et al. 2009). Die prognostische Bedeutung dieser Gene muss jedoch in gößeren Studien noch validiert werden.

Die durch GEP gewonnen Informationen über molekulare Varianten, welche der biologischen und klinischen Heterogenität der AML zugrunde liegen, erlauben neben

der molekularen Klassifikation der AML (Bullinger 2006) auch eine Einteilung in prognostische Gruppen. So kann anhand der GEP-Daten eine Vorhersage über molekulare Subgruppen der AML getroffen werden (Haferlach et al. 2005, Verhaak et al. 2009), was somit eine neue diagnostische Möglichkeit darstellt.

Vor allem in den Subgruppen der AML, in denen die prognostische Zuordnung bisher schwer möglich war, stellt die Genexpression eine bessere Möglichkeit dar, die Pathologie der Erkrankung zu erfassen. So korrelliert zum Beispiel die *FLT3*-ITD-Expression mit dem klinischen Ansprechen in AML-Fällen mit normalem Karyotyp (Bulliner et al. 2008) und stellt damit einen prognostischen Faktor dar. Auch in Fällen mit doppelter *CEBPA*-Mutation kann ein charakteristisches Genexpressionsmuster vorhergesagt werden, welches in Fällen mit nur einer *CEBPA*-Mutation nicht auftritt (Wouters et al. 2009b). Auch *CEBPA* kommt somit ein prognostischer Wert zu.

Durch die Genexpressionsmuster konnten demnach neue Subgruppen der AML von sowohl biologischer als auch klinischer Bedeutung aufgezeigt werden, die vormals nicht abgegrenzt werden konnten (Bullinger et al. 2004, Valk et al. 2004). Dazu gehören beispielsweise Fälle, die *CEBPA*-mutierten Fällen ähneln, in denen aber *CEBPA* über Hypermethylation des Promoters nicht mehr exprimiert werden kann (Wouters et al. 2007), oder auch CBF-AML-Fälle mit *KIT*-Wildtyp die aufgrund eines bisher unbekannten Mechanismus Expressionsmustern von Fällen mit *KIT*-Mutation entsprechen (Lück et al. 2010). Darüberhinaus konnten bei der CBF-AML Genexpressionsmuster identifiziert werden, welche die Heterogenität der Erkrankung aufzeigen (Bullinger et al. 2007). Der prognostische Vorhersagewert der Genexpressionsmuster konnte von unabhängigen Arbeitsgruppen validiert und weiterentwickelt werden (Bullinger et al. 2004, Metzeler et al. 2008, Radmacher et al. 2006).

Neue Technologien wie Exon Microarrays oder neue Hochdurchsatzsequenzierverfahren (next generation sequencing, NGS) können zukünftig weitere Einblicke gewähren. Beispielsweise können neue Informationen über alternative Transkript-Varianten gewonnen werden, d.h. alternatives Splicing, oder 3’ mRNA-Modifikationen, die zu einer veränderten mRNA-Stabilität und veränderter microRNA-Processierung führen (Mayr u. Bartel 2009).

1.2 microRNAs (miRNAs) in Tumorerkrankungen und Leukämien

Unter microRNA (miRNAs) versteht man kurze, endogene Ribonukleinsäure-Einzelstränge aus ca. 23 Nukleotiden, die eine neue Klasse an Genregulatoren darstellen. Anders als messengerRNA (mRNA) werden microRNAs nicht in Proteine translatiert, vielmehr ist ihre Funktion die posttranskriptionale Genregulation auf Ebene der mRNA. Die microRNAs wirken als negative Genregulatoren, d.h. sie vermindern die Expression ihrer Zielgene. Dadurch stellen microRNAs wichtige Regulatoren der Genexpression in physiologischen und pathologischen Zellvorgängen dar (Bartel 2009).

1.2.1 Biogenese und Funktionsweise der microRNAs

Der reife microRNA-Einzelstrang entsteht über eine Vielzahl von Zwischenschritten unter der Beteiligung verschiedener Enzymkomplexe (siehe Abbildung 1). Die meisten Gene, die eine microRNA kodieren, werden von einer RNA-Polymerase II transkribiert (Lee et al. 2004). Das entstandene Primärprodukt, primary-microRNA (pri-miRNA), hat eine Größe von hunderten bis hin zu tausenden Nukleotiden, die in einer Schleifenstruktur angeordnet sind. Die pri-miRNA weist posttranskriptionell am 5'-Ende ein MGppG-Cap und am 3'-Ende ein Poly-A-Schwanz auf (Cowland et al. 2007). Noch im Zellkern lagert sich der Mikroprozessor-Komplex zusammen. Dieser besteht vor allem aus der RNAse III Drosha und dem Doppelstrang RNA-bindenden (dsRBD) Protein DGCR8, Pasha genannt. Der Mikroprozessor-Komplex spaltet die pri-miRNA in die ca. 70-80 Nukleotide große precursor-microRNA (pre-miRNA), die sich in einer charakteristischen Haarnadelstruktur anordnet (Denli et al. 2004).

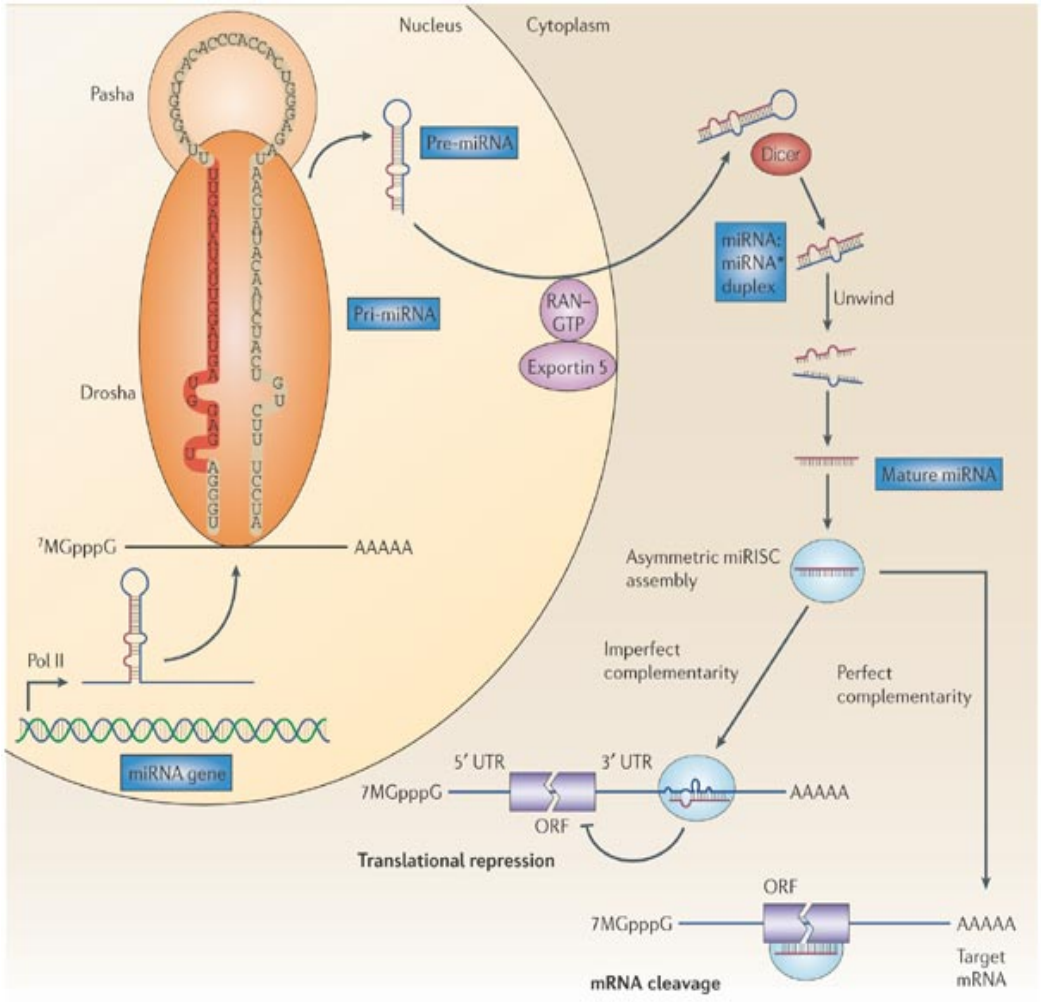


Abbildung 1: **Biogenese und Funktionsweise der microRNAs**

(Abbildung aus Esquela-Kerscher u. Slack 2006)

Abkürzungen:

miRNA = microRNA; Pol II = RNA-Polymerase II; 7MGppG = 7-Methyl-Guanosin-5'-Triphosphat-5'-Guanosin-Cap; AAAAA = Poly-Adenosin-Schwanz; Drosha = RNAse III; Pasha = Ko-Faktor = DGCR8 = „DiGeorge syndrome critical region gene 8"; RAN-GTP = Ran-Guanosintriphosphat; Dicer = RNAse III; RISC = „RNA-induced silencing complex"; UTR = „untranslated region"; ORF = „open reading frame"

Exportin 5 transportiert über einen RanGTP-abhängigen Mechanismus die pre-miRNA ins Zytoplasma (Zeng 2006). Dort wird die pre-miRNA von einer weiteren RNAse III, Dicer, in Anwesenheit der Doppelstrang RNA-bindenden (dsRBD) Proteine, TRBP und PACT, in zwei Einzelstränge gespalten (Lee et al. 2002).

Wie schon bei Drosha ist auch für die Funktion von Dicer die Anwesenheit der Proteine als Kofaktoren notwendig (Lee et al. 2006). Von den dabei entstehenden zwei Einzelstränge (miRNA:miRNA*) mit jeweils ca. 22 Nukleotiden Länge wird der

Strang abgebaut, der vermeintlich keine Funktion übernimmt. Der funktionelle, reife microRNA-Einzelstrang zeichnet sich durch eine relative Instabilität der Basenpaarung an seinem 5'-Ende aus (Bartel 2004).

Der reife microRNA-Einzelstrang lagert sich in den „RNA-induced silencing complex" (RISC) ein. Dieser besteht aus Dicer und Argonautproteinen, wie beispielsweise Ago2, als katalytische Komponente (Schwarz et al. 2003). Über Basenpaarung zwischen der microRNA und der Ziel-mRNA lagert sich der RISC-Komplex an die 3' untranslatierte Region (3'UTR) der Ziel-mRNA an. Der nachfolgende Mechanismus der Genregulation ist abhängig vom Grad der Übereinstimmung der Basenpaare (Esquela-Kerscher u. Slack 2006). Stimmen die Basensequenzen der microRNA und der Ziel-mRNA perfekt überein, so wird die mRNA direkt gespalten und degradiert. Bei nicht kompletter Übereinstimmung kommt es zu einer Hemmung der Translation. In beiden Fällen wird ein Gen-Silencing, d. h. eine verminderte Genexpression bewirkt. MiRNAs regulieren 10-30% aller menschlichen Gene, wobei ein einzelner microRNA-Strang auf mehrere verschiedene Gene Einfluss nehmen und ein Gen von mehreren verschiedenen microRNAs reguliert werden kann (Lewis et al. 2003). Dadurch nehmen microRNAs Einfluss auf verschiedene physiologische Zellprozesse, wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose.

1.2.2 microRNA in Neoplasien

Neoplasien entstehen durch eine Dysfunktion von Regulatoren des Zellwachstums, der Differenzierung und der Apoptose, was zu einem unkontrollierten Wachstum von entarteten Zellen führt. MicroRNAs wirken als Regulatoren für solche zelluläre Vorgänge, so findet sich in vielen Krebsarten und Leukämien auch eine veränderte microRNA-Expression. Etwa die Hälfte aller microRNA-Gene befindet sich in Krebs-assoziierten Genregionen, sog. „fragile sites" (Calin et al. 2004), was die Bedeutung der microRNAs bei der Onkogenese noch unterstreicht.

Bei verschiedenen Krebsarten lässt sich eine Assoziation mit einer veränderten microRNA-Expression zeigen. So ist z.B. die miR-125b-1 mit bestimmten Fällen von Neoplasien von Mamma, Lunge, Ovarien oder Zervix assoziiert (Calin et al. 2004). Bei kolorektalen Tumoren findet man eine verminderte Expression reifer miR-143 und miR-145 (Michael et al. 2003). In der Onkogenese können microRNAs gleichermaßen als Tumorsuppressoren und auch als Onkogene wirken.

1.2.3 microRNA als Tumorsuppressor

Wie auch die bisher bekannten Tumorsuppressoren, z.B. p53, wirken bestimmte microRNAs übermäßiger Zellproliferation, unzureichender Zelldifferenzierung oder gestörter Apoptose entgegen. Der Verlust dieser Tumorsuppressorfunktion der microRNA durch Gendeletion, Genmutation, epigenetische Veränderungen oder veränderte microRNA-Reifung kann dann zur Krebsentstehung beitragen (Esquela-Kerscher u. Slack 2006).

Als Beispiel hierfür sind miR-15a und miR-16-1 bei der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) zu nennen (Calin et al. 2005; Calin et al. 2008). Etwa die Hälfte aller CLL-Fälle zeigt eine Deletion der 13q14.3-Region im Genom (Döhner et al. 2000), in der die Gene der miR-15a und miR-16-1 zu finden sind (Calin et al. 2002). Die verminderte Expression der miR-15a und miR-16-1 durch Deletion der Genregion führt zu einer Überexpression des antiapoptotischen Genes *Bcl-2* (Cimmino et al. 2005). Aufgrund der verstärkten *Bcl-2*-Wirkung kann es durch fehlende Apoptose zur Leukämogenese in hämatopoetischen Zellen und somit zur Entstehung einer CLL kommen.

Ein weiteres Beispiel stellen die Mitglieder der *let-7*-Familie dar, die bei Lungenkrebs vermindert exprimiert werden (Takamizawa et al. 2004). Die zur *let-7*-Familie gehörigen miRNAs wirken als negative Regulatoren auf *Ras*-Gene, die ihrerseits als Onkogene wirken (Johnson et al. 2005). Durch die verminderte Expression dieser microRNAs, die als Tumorsuppressoren wirken, kommt es zu einer vermehrten Expression der *Ras*-Gene. Diese haben als Membran-assoziierte Signalproteine Einfluss auf Zellwachstum und –differenzierung, so dass es zu vermehrtem Zellwachstum und zu Zelltransformation kommt.

1.2.4 microRNA als Onkogen

MicroRNAs, die Zellwachstum positiv regulieren oder antiapoptotisch wirken, können durch Überexpression zur malignen Entartung beitragen und somit als Onkogen wirken.

Als Beispiel hierfür ist die miR-155 zu nennen, die in Zusammenhang mit *MYC* als Onkogen wirken kann. *MYC* nimmt Einfluss auf Zellproliferation und Apoptose (Pelengaris et al. 2002) und spielt bei der Entstehung hämatopoetischer Neoplasien eine wichtige Rolle (Hoffman et al. 2002). Das miR-155 Gen liegt im Bereich des *BIC*-Gens, welches ebenfalls in B-Zell-Lymphomen überexprimiert wird (Eis et al.

2005). Die kombinierte Überexpression von miR-155 / *BIC* und *MYC* führt zu einem gesteigerten onkogenen Effekt auf die Regulation der B-Zell-Entwicklung (Esquela-Kerscher u. Slack 2006).

Auch für die microRNAs des miR-17-92-Clusters konnte eine Verbindung zu B-Zell-Lymphomen gezeigt werden (He et al. 2005; O'Donell et al. 2005). Dabei wirken die microRNAs des miR-17-92-Clusters zusammen mit *Myc* ebenfalls als Onkogen, indem sie vermeintlich apoptotische Faktoren hemmen, deren Funktion es ist, einer *Myc*-Überexpression entgegen zu wirken. Durch den Ausfall der Hemmung kommt es durch *Myc* zu einer unkontrollierten Zellproliferation und somit zur Krebsentstehung.

1.2.5 Deregulierte miRNA-Expression in der AML

MicroRNAs spielen sowohl in ihrer Funktion als Tumorsupressoren als auch als Onkogene in der Entstehung einer AML eine wichtige Rolle (Chen et al. 2010).

Wie auch schon bei den GEP-Daten, konnte bei Untersuchung von microRNA-Expressionsmustern eine Zuordnung bestimmter Muster zu bestimmten zytogenetischen Subgruppen der AML, wie t(15;17), t(11q23), t(8;21) oder inv(16) erfolgen (Jongen-Lavrencic et al. 2008; Li et al. 2008). Ebenfalls möglich ist eine Zuordnung von microRNA-Expressionsmuster zu molekularen Subgruppen, wie AML mit *CEBPA*- und *NPM1*-Mutationen, oder AML mit deregulierter *MN1*-Expression (Jongen-Lavrencic et al. 2008; Langer et al. 2009; Marcucci et al. 2008a).

So findet man zum Beispiel in AML-Fällen mit einer *NPM1*-Mutation vermehrt miR-10a, miR-10b, miR-196a und miR-196b. Doch nicht nur eine Zuordnung in Subgruppen ist aufgrund der microRNA-Expressionsmuster möglich, sondern auch prognostische Aussagen können basierend auf der microRNA-Expression getroffen werden (Garzon et al. 2008; Marcucci et al. 2008b).

Um den Stellenwert der microRNAs als zuverlässige Biomarker für Diagnose und Prognose in AML-Fällen zu bekräftigen, werden jedoch noch weitere Studien benötigt.

Auch der Einsatz von NGS-Technologien kann neue, tiefere Einblicke in die microRNA-Maschinerie gewähren, vor allem auch, weil NGS weniger störanfällig ist als Techniken, die auf Hybridizierung basieren (Kuchenbauer et al. 2008). Unter Berücksichtigung dieser neuen Einblicke wird die Liste der microRNAs, die mit Zielgenen interagieren, die ihrerseits Einfluss auf die Tumorgenese haben, stetig länger (siehe Tabelle 3; Chen et al. 2010).

Zudem spielen microRNAs auch bei epigenetischen Veränderungen eine Rolle. Sie können dabei sowohl als Effektor als auch als Ziel der epigenetischen Maschinerie wirken. Durch die Methylierung von Promotern oder durch Histon-Modifikationen kann die Expression von microRNAs, wie auch die Expression anderer Gene, beeinflusst werden. So wird z.B. die Promotorregion der miR-223 durch das Produkt des *RUNX1-RUNX1T1*-Fusionsgens epigenetisch modifiziert und die Genexpression dadurch reprimiert. Durch Demythylierung der Promotorregion kann die miR-223-Expression wieder hergestellt werden, was leukämische Blasten zur Differenzierung veranlasst (Fazi et al. 2007). Die microRNA-Expression kann sich aber auch auf den epigenetischen Status anderer Gene auswirken, bei der AML sind z.B. DNA-Methyltransferasen das Ziel der miR-29b (Garzon et al. 2009).

Tabelle 3: Auswahl deregulierter microRNAs in der AML

(modifiziert nach Chen et al. 2010 und Havelange et al. 2009)

Abkürzungen:

AML = akute myeloische Leukämie; miR = miRNA = microRNA; *NPM1* = „nucleophosmin 1"; *NRAS* = „neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog"; *KRAS* = „v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog"; *HMGA2* = „high mobility group AT-hook 2"; APL = akute Promyelozytenleukämie; ATRA = all-trans-Retinsäure; *BCL2* = „B-cell CLL/lymphoma 2"; *MYB* = „v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)"; t(11q23) = Translokation 11q23; *MYC* = „v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)"; *BCL2L11* = „BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)"; *PTEN* = „phosphatase and tensin homolog"; *E2F1* = „E2 transcription factor 1"; *E2F2* = „E2 transcritpion factor 2"; *E2F3* = „E2 transcription factor 3"; *RASSF2* = „Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 2"; *APP* = „amyloid beta (A4) precursor protein"; *CDKN1A* = „cyclin-dependent kinase inhibitor 1A"; *RUNX1* = „runt-related transcription factor 1"; *MCL1* = „myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)"; *TCL1* = „T-cell leukemia/lymphoma 1"; *SP1* = „sp1 transcription factor"; *DNMT3A* = „DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha"; *DNMT3B* = „DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta"; *CDK4* = „cyclin-depent kinase 4"; *CCNE2* = „cyclin E2"; *FLT3* = „fms-related tyrosinkinase 3"; ITD = „internal tandem duplication"; AML M4 = akute myelomonozytäre Leukämie (nach FAB = French-American-British); AML M5 = akute Monoblasten-/ Monozyten-Leukämie (nach FAB); HSZ = hämatopoetische Stammzellen; FOXP3 = „forkhead box P3"; *MAP3K7IP2* = „mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 2"; *INPP5D* = „inositol polyphosphate-5-phosphatase"; *CEBPB* = „CCAAT/enhancer binding protein beta"; *CEBPA* = „CCAAT/enhancer binding protein alpha"; *PLAG1* = „pleiomorphic adenoma gene 1"; *MLL* = „mixed-lineage leukemia"; GFI1 = „growth factor independent 1 transcription repressor"; *HOXB8* = „homeobox B8"; *HOXC8* = „homeobox C8"; *HOXD8* = „homeobox D8"; *HOXA7* = „homeobox A7"

miRNA	Deregulation in der AML / potentielle Funktion bei der AML	Regulatoren	Auswahl bekannter Zielgene
let-7a	In *NPM1*-mutierten AML-Fällen hochreguliert	LIN28	*NRAS, KRAS, HMGA2*
miR-15 and miR-16	In APL-Fällen nach ATRA-Therapie hochreguliert	-	*BCL2, MYB*
miR-17-92 Cluster	In Leukämien mit t(11q23) hochreguliert, In APL-Fällen herunter reguliert; fördert Zellproliferation, hemmt Zelldifferenzierung und fördert Leukämogenese	MYC, E2F1, E2F2 und E2F3	*BCL2L11, PTEN, E2F1, E2F2, E2F3, RASSF2, APP, CDKN1A, RUNX1*
miR-29b	In Leukämien mit t(11q23) herunter reguliert		*MCL1, TCL1, SP1, DNMT3A, DNMT3B*
miR-34b	In Leukämien mit t(11q23) herunter reguliert	-	*CDK4, CCNE2*
miR-155	In *FLT3*-ITD –mutierten AML-Fällen hochreguliert, in Subgruppen der AML überexprimiert (insbesondere AML M4 und M5); anhaltende Expression in HSZs verursacht myeloproliferative Störungen	FOXP3	*MAP3K7IP2, INPP5D, CEBPB*
miR-181a	In *CEBPA*-mutierten AML-Fällen hochreguliert, inverse Korrelation mit der Prognose	-	*PLAG1*
miR-196a and miR-196b	In *NPM1*-mutierten AML-Fällen hochreguliert, in Leukämien mit *MLL*-Translokationen hochreguliert, in APL-Fällen signifikant herunter reguliert, fördert Zellproliferation und hemmt Zelldifferenzierung	GFI1	*HOXB8, HOXC8, HOXD8, HOXA7*
miR-223	In Leukämien mit Deletion 5q und 7q herunter reguliert	RUNX1, CEBPA	*E2F1*

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die akute myeloische Leukämie ist sowohl eine klinisch als auch biologisch sehr heterogene Erkrankung. Vor allem innerhalb zytogenetisch nicht gut charakterisierten AML-Subgruppen, wie die Fälle mit normalem Karyotyp (CN-AML), also ohne nachweisbare zytogenetische Veränderung, beobachtet man eine große klinische Heterogenität. In den letzten Jahren wurde zunehmend der Einfluss molekularer Marker wie Genmutationen oder Genexpressionsmuster bei der, der AML zugrunde liegenden Pathologie deutlich. So konnte die Klassifikation der AML-Subgruppen fortwährend verbessert und erweitert werden. Jedoch ist derzeit immer noch keine allgemeingültige Subklassifizierung und Risikostratifizierung insbesondere all der AML-Fälle möglich, welche einen normalen Karyotyp aufweisen, verfügbar.

Mit dem Ziel weitere Marker zu finden, welche eine bessere Subklassifizierung und Risikostratifizierung zulassen, wurde in der vergangenen Zeit zunehmend ein Augenmerk auf veränderte microRNA-Expressionsmuster gerichtet. Die Bedeutung der microRNAs in der Tumorgenese und insbesondere in der Entstehung der AML wurde bereits durch eine Vielzahl von Arbeiten postuliert und bestätigt.

In der vorliegenden Arbeit soll die Rolle der Expression von miR-181a, welches als potentiell prognostisch relevanter Marker in der AML bereits postuliert wurde (Marcucci et al. 2008b), weiter evaluiert werden. Mit Hilfe eines quantitativen RT-PCR Assays soll in einer großen Anzahl von AML-Fällen mit normalem Karyotyp die miR-181a Expression untersucht werden, um die prognostische Bedeutung dieses Markers zu überprüfen. Über eine Korrelation mit klinischen und molekulargenetischen Daten soll ferner überprüft werden, ob miR-181a ein Surrogatmarker für einen bereits bekannten Risikofaktor darstellt. Desweiteren soll in der vorliegenden Arbeit auch die biologische Relevanz von miR-181a untersucht werden. Um neue Einblicke in die molekulare Pathogenese der AML sowie die Rolle von miR-181a zu gewinnen, wird der Einfluss von unterschiedlichen miR-181a Expressionsleveln in Leukämiezelllinienmodellen untersucht. Das übergeordnete Ziel hierbei ist ein besseres Verständnis der potentiell an der Leukämogenese beteiligten microRNA miR-181a und ihrer Zielgene zu gewinnen.

2. Material und Methodik

2.1 Patientenproben

Es wurden insgesamt 131 Patienten-Proben mit einer AML mit normalem Karyotyp, d. h. ohne chromosomale Aberrationen bei Diagnosestellung, untersucht. Alle Proben wurden von Patienten gewonnen, die in randomisierte, multizentrische Studien der Deutsch-Österreichischen AML Studiengruppe (AMLSG) eingeschlossen wurden: 83 Fälle entstammen der AMLSG HD98A Studie, 47 Fälle entstammen der AMLSG 07-04 Studie. Die Patienten waren über den Charakter der Studie aufgeklärt und gaben ihre Einwilligung zur Teilnahme an der Studie, die auch die Begleituntersuchungen im Rahmen dieser Studie mit einschlossen. Bei beiden Studien handelt es sich um eine prospektive multizentrische Phase III Studie, in die jährige Patienten im Alter zwischen 16 und 60 Jahren mit einer de novo oder einer sekundären, postmyelodysplatischen AML eingeschlossen wurden. Die Diagnose wurde morphologisch, zytochemisch und durch immunologische Phänotypisierung gesichert.

Zu allen diesen Proben lagen sowohl umfangreiche klinische Daten vor, die im Rahmen der Studienprotokolle erhoben wurden, als auch eine umfangreiche molekulargenetische Charakterisierung (Mutationsstatus für die Gene *NPM1*, *FLT3*, und *CEBPA*). Die Proben wurden für unsere Untersuchung zufällig und nicht anhand des Genmutationsstatus ausgewählt. Es wurden sowohl Knochenmarkproben als auch Proben des peripheren Blutes verwendet. Erstere wurden aus der Punktion des Beckenkamms, letztere durch Venenpunktion gewonnen. Alle Proben wurden vor Therapiebeginn entnommen.

Klinische und molekulargenetische Charakteristika der Patienten

Von den 83 Fällen der AMLSG HD98A Studie waren 39,8% (33/83) männlich, 60,2% (50/83) weiblich mit einem medianen Durchschnittsalter von 46,5 Jahren (23 – 60 Jahre). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung wiesen die Patienten eine mediane Leukozytenzahl von 23,5 G/l (0,83 – 191,96 G/l) sowie im Median einen Blastenanteil im Knochenmark von 80% (9 – 99%) auf.

Der Genmutationsstatus ergab für 57,8% (48/83) eine *NPM1*-Mutation, für 43,4% (36/83) eine *FLT3*-ITD-Mutation, für 14,5% (12/83) eine *CEBPA*-Mutation. Eine

prognostisch günstige Kombination aus *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutation wiesen 26,5% (22/83) auf.

Von den 47 Fällen der AMLSG 07-04-Studie waren 52,1 % (25/47) männlich und 47,9% (23/47) weiblich, mit einem medianen Durchschnittsalter von 51 Jahren (25 – 60 Jahre). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung betrug die mediane Leukozytenzahl 27,35 G/l (0,9 – 177,9 G/l), der Blastenanteil im Knochenmark war im Median 72,5% (20 – 92%).

Eine *NPM1*-Mutation zeigten 48,9% (23/47) der Patienten, eine *FLT3*-ITD-Mutation hatten 40,4% (19/47) und eine Mutation in *CEBPA* zeigten 10,6% (5/47). Eine prognostisch günstige Kombination aus einer *NPM1*-Mutation und einer *FLT3*-ITD-Mutation wiesen 23,4% (11/47) der Patienten auf.

Tabelle 4: Klinische und genetische Daten der untersuchten Patientenproben

Abkürzungen:

AML = akute myeloische Leukämie; AMLSG = AML Studiengruppe; n = Fallzahl; G/l = Giga pro Liter; *FLT3* = „fms-related tyrosinkinase 3"; ITD = „internal tandem duplication"; *CEBPA* = „CCAAT/enhancer binding protein alpha"; *NPM1* = „nucleophosmin 1"

Merkmale bei Diagnosestellung	**AMLSG HD98A Studie (n=83 Fälle)**	**AMLSG 07-04 Studie (n=47 Fälle)**
Geschlecht		
männlich	33/83 (39,8%)	25/47 (52,1%)
weiblich	50/83 (60,2%)	23/47 (47,9%)
Alter		
im Mittelwert	46,6 Jahre	48,3 Jahre
im Median	46,5 Jahre (23 – 60 Jahre)	51 Jahre (25 – 60 Jahre)
Leukozytenzahl (Median, in G/l)	23,5 (0,83 – 191,96)	27,35 (0,9 – 177,9)
Blastenanteil im Knochenmark	80% (9 – 99%)	72,5% (20 – 92%)
Genmutationsstatus		
FLT3-ITD	36/83 (43,4%)	19/47 (40,4%)
CEBPA	12/83 (14,5%)	05/47 (10,6%)
NPM1	48/83 (57,8%)	23/47 (48,9%)
FLT3-ITD + NPM1	22/83 (26,5%)	11/47 (23,4%)
Gesamtüberleben (Median, in Tagen)	568,5 (18 – 3591)	466 (38 – 1490)
Ereignis-freies Überleben (Median, in Tagen)	246,5 (10 – 3591)	129,5 (15 – 1347)

2.1.1 Therapie im Rahmen der AMLSG HD98A und 07-04 Studien

Alle Patienten erhielten zuerst eine Doppelinduktionstherapie mit Idarubicin, Cytosin-Arabinosid und Etoposid (ICE). Bei allen Patienten, bei denen nach der Doppelinduktion eine partielle Remission (PR) oder ein komplette Remission (CR) erreicht werden konnte, wurde in beiden Studien eine Konsolidierungstherapie mit hochdosiertem Cytosin-Arabinosid durchgeführt.

In der AMLSG HD98A Studie wurden die Patienten im Anschluss in Abhängigkeit ihres zytogenetischen Risikoprofils in Behandlungsgruppen stratifiziert. Patienten mit normalem Karyotyp, d.h. Patienten mit Standardrisiko, wurden im Falle des Vorhandenseins eines HLA-identischen Familienspenders mittels allogener Blutstammzelltransplantation (BSCT) therapiert. Alle Standardrisikopatienten ohne Familienspender wurden zwischen einem weiteren Therapie-Zyklus mit Mitoxantron und Cytarabin (HAM) versus einer autologen BSCT randomisiert (siehe Abbildung 2).

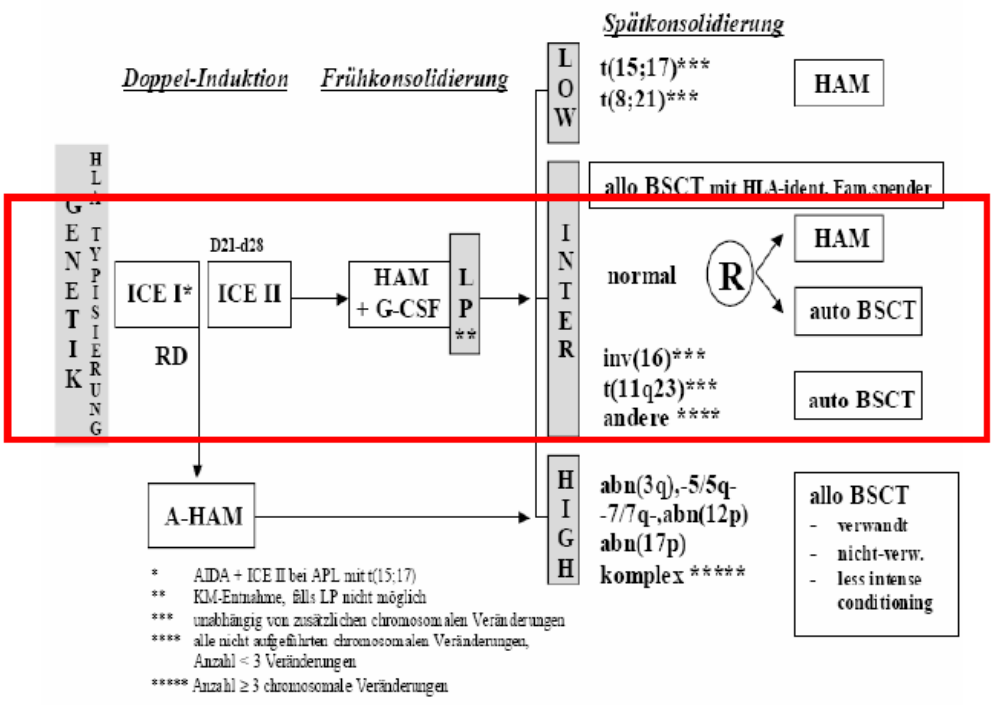


Abbildung 2: Therapieschema der AMLSG HD98A Studie

Abkürzungen:

AML = akute mayeloische Leumämie; AMLSG = AML StudiengruppeHLA = humanes Leukozyten-Antigen; ICE = Idarubicin, Cytosin-Arabinosid und Etoposid; AIDA = all-trans-Retinolsäure und Idarubicin; APL = akute Promyelozytenleukämie; t(15;17); t(11q23); t(8;21) = Translokation (15;17); (11q23); (8;21); HAM = Hochdosis Cytarabin und Mitoxantron; G-CSF = Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor; LP = Liquorpunktion; KM = Knochenmark; BSCT = Blutstammzelltransplantation; R = randomisierte Zuordnung; allo = allogen; auto = autolog; inv(16) = Inversion 16; abn (3q); (12p); (17p) = Abnormalität in (3q); (12p); (17p); -5/5q-; -7/7q = Deletion (5/5q); (7/7q); RD = „rest disease“

In der AMLSG 07-04 Studie wurden die Patienten vor dem ersten Konsolidierungszyklus mit Cytosin-Arabinosid in vier Arme randomsiert und erhielten parallel zur Konsolidierungschemotherapie entweder keine zusätzliche Substanz, all-trans Retinolsäure (ATRA), Valproinsäure (VPA) oder beide Substanzen. Patienten mit normalem Karyotyp wurden im Falle des Vorhandenseins eines HLA-identischen Familienspenders nach der erste Konsolidierung mittels allogener Blutstammzell-Transplantation therapiert, bei allen Standardrisikopatienten ohne Familienspender erfolgten zwei weitere Konsolidierungszyklen (siehe Abbildung 3).

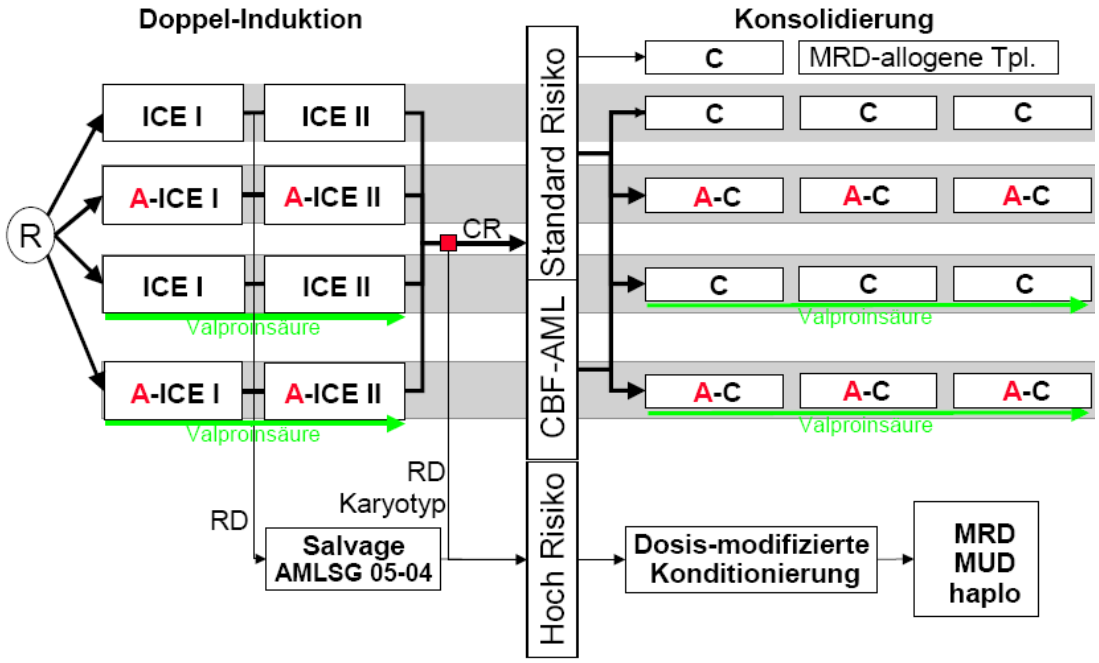


Abbildung 3: **Therapieschema der AMLSG 07-04 Studie**

(Abbildung aus dem Studienprotokoll der AMLSG 07-04-Studie)

Abkürzungen:

AML = akute myeloische Leukämie; AMLSG = AML Studiengruppe; R = randomisierte Zuordnung; ICE = Idarubicin, Cytosin-Arabinosid und Etoposid; A- = all-trans-Retinolsäure; RD = „rest disease“; CR = komplette Remission; C = Cytarabin; CBF = „core-binding-factor“; MRD = „minimal rest disease“; MUD = „matched unrelated donor“; Tpl. = Transplantation

2.2 RNA-Isolation mittels Trizol®

Zur Isolation von RNA mittels Trizol®-Reagenz (Chomczynski 1993) werden die Zellpellets (1-3 x 10^7 Zellen) auf Eis mit 1 ml Trizol® lysiert. Anschließend werden die Pellets homogenisiert, indem sie mehrfach durch eine 12 cc Nadel in eine 5 ml Spritze aufgezogen werden. Zur vollständigen Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe wird das Homogenisat für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur anschließenden Phasentrennung werden 0.2 ml Chloroform pro 1 ml Trizol® hinzu gegeben und das 1,5 ml Safe Lock Gefäß (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für mindestens 15 s kräftig geschüttelt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min werden die Proben bei 12000 x g für 15 min bei 4°C in einer CS 15 R Zentrifuge (Fa Beckman Instruments, Palo Alto, Californien, USA) zentrifugiert. Die dadurch erfolgte Phasentrennung ergibt eine obere, farblose Phase, eine mittlere, weißliche Zwischenphase (entspricht dem Proteinanteil) und am Boden des Tubes eine rötliche Phenol-Chloroform-Phase. Da sich die RNA in der oberen, farblosen Phase befindet wird diese mit einer gestopften Pipette vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dazu werden 0,5 ml Isopropanol gegeben und mittels Vortex Genie 2 (Fa Scientific Industries, Bohemia, New York, USA) werden die RNA in der farblosen Phase und der Isopropylalkohol gut vermischt und anschließend bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Danach erfolgt ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 12000 x g für 10 min bei 4°C, der für das Absetzen der RNA am Boden des Tubes sorgt. Der Überstand wird vorsichtig abgegossen und die RNA mit 1 ml 70% Ethanol (4°C) durch Vortexen gemischt und gewaschen, anschließend erfolgt eine weitere Zentrifugation bei 12000 x g für 10 min bei 4°C. Auch der hierbei entstehende Überstand wird verworfen und es erfolgt eine weitere Zentrifugation in einer Eppendorf 5415 D Zentrifuge (Fa Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min. Überschüssige Flüssigkeit wird mittels Pipettenspitzen aus dem Tube entfernt und anschließend wird das Pellet für etwa 5 min luftgetrocknet. Schließlich wird das Pellet in 0,1 ml RNAse-freiem Wasser gelöst, gemischt und in einem Heizblock (Fa Liebisch, Bielefeld, Deutschland) bei 65°C für 5 min inkubiert.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgt mittels des Nanodrop ND 1000 Spektrophotometer (Fa Peqlab, Erlangen, Deutschland). Dazu wird aus 1,2 µl unverdünnt aufgebrachter Probe der RNA-Gehalt anhand des Extinktionswertes bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.2.1 Kontrolle der RNA-Qualität

Neben der Bestimmung der RNA-Konzentration kann mit Hilfe des Nanodrops auch die Qualität der Probe analysiert werden, indem der Quotient der Extinktionswerte bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge betrachtet wird. Bei einem Quotienten der Werte aus 260 nm und 280 nm von 2 kann die RNA als rein angesehen werden.

Neben der Betrachtung des 260 nm zu 280 nm-Wertes wird die Qualität der isolierten RNA mittels Gelelektrophorese beurteilt. Dazu wird ein 1,5%iges Agarosegel aus 1,5 g Agarose, 100 ml TAE-Puffer und 5 µl Ethidiumbromid hergestellt, das mit 0,5 µg RNA, 1 µl 10x „Blue juice gel buffer“ und RNAse-freiem Wasser (mit einem Gesamtvolumen von 10 µl) beladen wird. Die Auftrennung erfolgt in einer Horizon 11-14 Elektrophoresekammer (Fa Life Technologies, Gathersburg, USA), die mit ca. 500 ml TAE-Puffer gefüllt wird. Dazu wird für ca. 1 h eine Stromstärke von 100 mA (Netzgerät: Biometra Pour Pack p25, Fa Biometra, Göttingen, Deutschland) angelegt. Die für RNA charakteristische Bänderung wird analysiert, indem das zugegebene Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht wird. Idealerweise zeigen sich zwei Banden, die der ribosomalen RNA entsprechen, wobei die 28S-Bande doppelt so intensiv sein sollte wie die 18S-Bande.

2.3 RNA-Isolation mittels miRVana®

Bei der RNA-Isolation mittels des miRVana miRNA Isolation Kit®, bestehend aus Reagenzien, „collection tubes“ und Filtereinsätzen (Fa. Ambion Inc, Austin, Kalifornien, USA), wird auf die Zellpellets (1-3 x 10^7 Zellen) 0,6 ml „lysis/binding solution“ gegeben. Durch Auf- und Abpipettieren werden die Zellen und die denaturierende Lösung vermischt. Anschließend werden 60 µl „miRNA Homogenate Additive“ hinzugegeben und durch mehrfaches Invertieren gut vermischt. Nach 10 min Inkubation auf Eis werden 0,6 ml „Acid-Phenol:Chloroform“ hinzugegeben, was zur Präzipitation der RNA in der Probe führt. Nach 1 min Mischen mittels Vortexer werden die Proben bei 10000 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die dadurch erfolgte Phasentrennung ergibt eine untere farblose Phase, eine milchige Zwischenphase und eine obere, ebenfalls farblose Phase, welche die gewünschte RNA enthält. Ohne die Zwischenphase zu berühren wird die obere Phase in ein neues Tube überführt, anschließend wird soviel 100%iger Ethanol zugegeben, das es dem 1,25fachem Volumen der überführten oberen Phase entspricht. Nach

mehrfachem Invertieren wird das Lysat-Ethanol-Gemisch auf einen Filtereinsatz in einem „collection tube“ gegeben und bei 10000 x g für 12 s bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die gewünschte RNA, bzw. miRNA, bleibt im Fieberglas-Filtereinsatz hängen, der im „collection tube“ gesammelte Durchfluss wird verworfen. Auf den Filter wird nun 0,7 ml „Wash Solution 1“ gegeben und bei 10000 x g für 5-10 s bei Raumtemperatur zentrifugiert, der dabei entstehende Durchfluss wird verworfen. Nun wird zweimal mit 0,5 ml „Wash Solution 2/3“ bei 10000 x g für 10 s bei Raumtemperatur zentrifugiert und jeweils der Durchfluss verworfen. Anschließend wird nochmals alle Flüssigkeit aus dem Filter zentrifugiert, so dass nur noch aufgereinigte RNA im Filter zurückbleibt. Der Filter wird nun in ein neues „collection tube“ eingesetzt und mit 0,1 ml auf 95°C vorgewärmtem RNAse-freiem Wasser bei maximaler Geschwindigkeit für 20-30 s zentrifugiert. Der dabei entstehende Durchfluss enthält die gewünschte Gesamt-RNA.
Auch bei der mittels miRVana® isolierten RNA erfolgt die Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des NanoDrop und die Qualitätsanalyse mittels einer Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2 und 2.2.1).

2.4 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR stellt eine Anwendungsmöglichkeit der klassischen Polymerasekettenreaktion (PCR) dar, bei der *in vitro* DNA amplifiziert werden kann (Mullis et al. 1986). Mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) ist es möglich zunächst aus RNA komplementäre DNA (cDNA) herzustellen und diese dann anschließend mittels PCR zu amplifizieren.

2.4.1 SuperScript III® First Strand Synthesis System für die qRT-PCR

Zur Umschreibung mittels Super Script III® wird zunächst ein RNA-Primer-Mix hergestellt, der aus 1 µl „random hexamers“ als Primer, 1 µl 10 mM dNTP-Mix und 2 µg RNA sowie DEPC-behandeltem Wasser mit einem gesamten Zielvolumen von 10 µl besteht. Die Denaturierung der RNA erfolgt bei 65°C für 5 min im GeneAmp PCR System 9700 (Fa. Applied Biosystems Inc, Foster City, Kalifornien, USA). Anschließend werden 10 µl cDNA-Synthesemix, bestehend aus 2 µl 10x RT-Puffer, 4 µl 25 mM $MgCl_2$, 2 µl M DTT, 1 µl RNAse OUT, sowie 1 µl Super Script III RT, hinzu gegeben. Nun wird diese Mischung zur Durchführung der Reversen Transkription zunächst für 10 min bei 25°C, dann für 50 min bei 50°C und anschließend für 5 min

bei 85°C zur Transkription in die PCR-Maschine gestellt. Nach Zugabe von 1 µl RNAse H, welche spezifisch RNA aus RNA/DNA-Duplices spaltet, wird die Probe erneut für 20 min bei 37°C in die PCR-Maschine gestellt, um die entstandene cDNA-Probe durch Denaturierung der RNA zu reinigen.

2.4.2 TaqMan® MicroRNA Assay

Durch die Umschreibung mittels TaqMan® MicroRNA Assay entsteht durch Zugabe spezifischer Primer nur die gewünschte microRNA als komplementäre DNA (cDNA). Dazu setzen die spezifischen „looped“ Primer am 3'-Ende der gewünschten microRNA an und können durch die „looped transcription“ die komplette Länge der gewünschten microRNA transkribieren (siehe Abbildung 4). So wurden die zu untersuchenden microRNAs, miR-374 und miR-181a, aus den isolierten Patientenproben und den ausgewählten Standards umgeschrieben.

Es werden zunächst 10 µl Master-Mix, bestehend aus 4,1 µl Nuklease-freiem Wasser, 1,5 µl RT buffer, 0,2 µl 100 mM dNTPs, 3 µl spezifischem „looped“ Primer, 0,2 µl RNAse Inhibitor und 1 µl MultiScribe RT hergestellt. Dazu werden 10 ng der RNA und Nuklease-freies Wasser mit einem gesamten Zielvolumen von 5 µl gegeben und nach kurzer Zentrifugation für 5 min auf Eis inkubiert. Die Reverse Transkription erfolgt bei 16°C für 30 min, bei 42°C für 30 min und anschließend bei 85°C für 5 min in der PCR-Maschine.

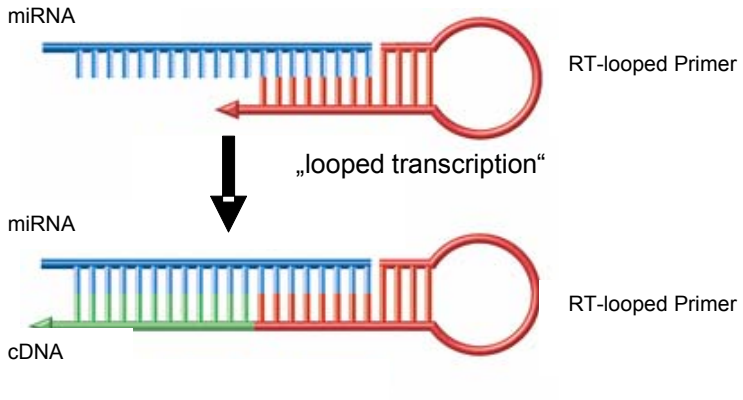


Abbildung 4: **Darstellung der „looped transcription“**
(modifiziert nach Ambion)

Abkürzungen:
miRNA = microRNA; RT = Reverse Transkriptase; cDNA = komplementäre DNA

2.5 quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR stellt ebenfalls eine Anwendungsmöglichkeit der klassischen Polymerasekettenreaktion (PCR) dar. Die Quantifizierung der gewonnenen DNA erfolgt mittels Fluoreszenzmessungen während der einzelnen PCR-Zyklen, da durch Zugabe fluoreszierender Farbstoffe zu Beginn der PCR mit zunehmender DNA-Menge auch das Fluoreszenzsignal zunimmt. Neben der direkten Verwendung eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR Green I®) kann auch der Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (TaqMan®-Sonden) verwendet werden (siehe Abbildung 5), um eine Quantifizierung zu erreichen.
In beiden Fällen wird eine MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate (Fa Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) präpariert, mit einem MicroAmp® 96-Well Optical Adhesive Film (Fa Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) versehen, im ABI Prism 7900 HT fast (Fa Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) die PCR durchgeführt und das dabei entstehende Fluoreszenzsignal gemessen.

2.5.1 SYBR Green I®

Fluoreszierende Farbstoffe wie SYBR Green I® werden unspezifisch in die doppelsträngige DNA eingebaut, mit Zunahme der DNA steigt damit auch das Fluoreszenzsignal von Zyklus zu Zyklus. Ein Nachteil ist dabei, dass mittels des

unspezifischen Farbstoffes unter anderem auch unspezifische Artefakte, wie z.B. Primer-Dimere miterfasst werden. Darum muss bei Anwendung des SYBR Green I® nach beendeter PCR-Reaktion eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden, bei der durch langsame Temperaturerhöhung die entstandenen DNA-Doppelstränge wieder voneinander getrennt werden. Dies führt zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals. Diese Trennung erfolgt bei einer für die jeweiligen PCR-Produkte spezifischen Temperatur, so dass unspezifische Artefakte vom gewünschten PCR-Produkt unterschieden werden können.

Zu 10 µl 2 x Fast SYBR Green® Master Mix werden je 1 µl des Vorwärts- und Rückwärts-Primers, spezifisch für den zu amplifizierenden cDNA-Abschnitt, und 3 µl Aqua bidestillata gemischt und in die 96-well-Platte gegeben. Dazu werden pro well 5 µl der 1:10 verdünnten cDNA gegeben. Nach Zentrifugation der Platte in einer Multifuge 4Kr- Zentrifuge (Fa. Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA) bei 1200 rpm für 1 min bei Raumtemperatur wird die Platte in den ABI Prism 7900 HT fast (Fa Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) gestellt und die Messung gestartet. Das Gerät durchläuft dabei folgende Schritte: Denaturierung bei 95°C für 20 s, dann 40 Wiederholungen von 5 s bei 95°C, 20 s bei 60°C und 20 s bei 69°C, wobei in diesem letzten Schritt in jedem Zyklus die Fluoreszenz-Messungen ablaufen. Zum Abschluss erfolgt die Schmelzkurvenanalyse, dazu wird unter ständiger Fluoreszenz-Messung die Temperatur langsam erhöht.

2.5.2 TaqMan®

Die spezifischen TaqMan®-Sonden nutzen den Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET), bei dem anhand der Wellenlänge des von den Farbstoffen emittierten Lichtes auf die Lokalisation der Farbstoffe zueinander geschlossen werden kann (Livak et al. 1995) (siehe Abbildung 5).

Die TaqMan®-Sonde ist ein Oligonukleotid, das an einem Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff als „reporter“ R’ und am anderen Ende mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff als „quencher“ Q versehen ist. Bei intakter Sonde sind beide Fluoreszenzfarbstoffe in örtlicher Nähe lokalisiert, so dass der „reporter“ von Licht mit einer spezifischen Wellenlänge angeregt wird und dadurch seinerseits Licht mit einer bestimmten Wellenlänge E1 emittiert. Dabei entspricht E1 dem Anregungsspektrum A2 des „quencher“. Somit emittiert der „quencher“ Licht mit einer bestimmten Wellenlänge E2, die nicht der Wellenlänge des emittierten Lichtes des „reporters“

entspricht. Das Oligonukleotid ist spezifisch für einen bestimmten Teil der verwendeten DNA und wird bei der Synthese des Gegenstranges durch die 5'3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase gespalten. Dadurch entfernen sich „reporter" und „quencher" voneinander, wodurch vermehrt das vom „reporter" emittierte Licht mit einer bestimmten Wellenlänge gemessen werden kann. Die Fluoreszenzmessung erreicht dadurch eine hohe Spezifität.



Abbildung 5: **qRT-PCR mit einer TaqMan®-Sonde**

Abkürzungen:

qRT-PCR = quantitative Real-Time-Polymerasekettenverfahren; R' = „reporter"-Fluoreszenzfarbstoff, Q = „quencher"-Fluoreszenzfarbstoff, Taq = Taq-Polymerase, A1 = Anregungsspektrum des „reporter"-Fluoreszenzfarbstoffes R', A2 = Anregungsspektrum des „quencher"-Fluoreszenzfarbstoffes Q; E 1 = Emissions-spektrum des „reporter"-Fluoreszenzfarbstoffes R', E 2 = Emissionsspektrum des „quencher"-Fluoreszenzfarbstoffes Q

Zunächst werden pro well zu 1,1 µl der spezifischen TaqMan® MicroRNA Assay-Sonden, 10,7 µl TaqMan® MasterMix und 8,2 µl Aqua bidestillata gegeben. Dazu werden 1,4 µl der miRNA-spezifisch umgeschriebenen cDNA gegeben. Nach Zentrifugation der Platte in der Multifuge 4Kr-Zentrifuge bei 1000 rpm für 1 min bei 4°C wird sie in den ABI Prism 7900 HT fast (Fa Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) gestellt und die Messung gestartet. Nun werden folgende Schritte durchlaufen: 10 min bei 95°C und mit 40 Wiederholungen 15 s bei 95°C und 1 min bei 65°C.

Die Messung der miR-181a und der miR-374 als endogene Kontrolle erfolgte für jede AML-Patientenprobe in Triplikaten, wobei der Mittelwert der drei Messungen im weiteren Verlauf benutzt wurde. Bei jeder Messung wurde eine für die miR-181a passende Zelllinie, ME-I (humane AML-Zelllinie), als Standard in Duplikaten

mitgemessen. Auf diese Weise wurde eine Standardkurve ermitteln, mit deren Hilfe im weiteren Verlauf die Quantität ermittelt werden konnte. Dazu wurden die Proben der Zelllinie von Standard 1 als reine Probe bis hin zu Standard 5 um jeweils 1:10 mit Aqua bidestillata verdünnt. Die Standardkurve ergab sich dann aus den jeweiligen Mittelwerten der Duplikate.
Zudem wurden bei allen Messungen jeweils eine Probe gemessen, die ohne Zugabe von Reverser Transkriptase bei der RT-PCR behandelt wurde, um Fehler durch etwaige Kontaminationen zu verhindern. Auch das Aqua bidestillata wurde gemessen, um auch hier eventuelle Fehlmessungen aufzudecken.

2.5.3 Auswertung der qRT-PCR Ergebnisse (Normalisierung)

Der Mittelwert der in Triplikaten gemessenen miR-181a Expression wurde durch den Mittelwert der in Triplikaten gemessenen miR-374 Expression dividiert. Die miR-374 hatte sich in Vorarbeiten als geeignete endogene Kontrolle gezeigt, da sie in allen getesteten Zellen gleichmäßig exprimiert wird. Die Normalisierung mit einer endogenen Kontrolle dient vor allem dazu Ladungsfehler zu vermeiden.

2.5.4 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der qRT-PCR Analyse wurde mittels der Software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornien, USA) durchgeführt. Für die Korrelation der normalverteilten qRT-PCR Daten mit molekularen Markern wurde zur Einschätzung der statistischen Signifikanz ein t-Test verwendet. Für die Überlebensanalysen wurde eine Kaplan-Meier-Kurve verwendet und der p-Wert mit einer „log rank“ Statistik berechnet. Alle angegebenen p-Werte wurden 2-seitig berechnet, als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt.

2.6 miR-181a: Identifizierung potentieller Zielgene

Um die Bedeutung der miR-181a Gen-Deregulation in der AML besser zu verstehen, wurden vermeintliche Zielgene der humanen microRNA miR-181a mittels integrativer Analyse von bereits vorhandenen mRNA- und miRNA-Datensätzen identifiziert. Microarray-basierte mRNA und miRNA Expressionswerte, die für ein Kollektiv von n=91 AML-Fällen zur Verfügung stehen, wurden benutzt, um mit der miR-181a Expression assoziierte Genexpressionsmuster zu identifizieren. Mit Hilfe einer SAM-(Significance Analysis of Microarrays) Analyse konnte ein entsprechendes

Genmuster identifiziert werden, welches 90 vermeintliche miR-181a Zielgene ergab. In zwei unabhängigen MicroRNA-Datenbanken, miRGator und miRBase, wurden diese ermittelten Gene als miR-181a targets vorausgesagt (http://genome.ewha.ac.kr/miRGator/miRGator.html und www.mirbase.org).
Nachfolgend führten wir für die putativen Kandidatengene eine Literaturrecherche durch, um Gene mit bekannter Funktion in Tumorgenese, Zellzyklusregulation oder mit Lokalisation in von genomischen Veränderungen betroffenen Regionen zu identifizieren und so die Liste vermeintlicher miR-181a Zielgene mit möglicher Rolle in der Leukämogenese auf 8 Gene eingrenzen zu können.

2.7 Primerdesign für potentielle miR-181a Zielgene

Mit Hilfe der Datenbank Ensembl (www.ensembl.org) und Primer3 Version 0.4.0 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3) wurden für alle 8 vermeintlichen Zielgene (siehe unten) Primer entworfen und anschließend von der Fa. Invitrogen Life Technologies, Grand Island, New York, USA hergestellt.

Tabelle 5: Primer der Zielgene

Abkürzungen:
[b] = Basen; *AKT3* = „v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma)"; *BCL6* = „B-cell CLL/lymphoma 6"; *BMPR2* = „bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)"; *CDC42BPA* = „CDC42 binding protein kinase alpha"; *DUSP5* = „dual specificity phosphatase 5"; *IRS2* = „insulin receptor substrate 2"; *PLA2G4A* = „phospholipase A2"; *SCHIP1* = „schwannomin interacting protein 1"; A- = Adenin; C- = Cytosin; G- = Guanin; T- = Thymin

Gen	Produkt-größe [b]	Vorwärts Sequenz	Rückwärts Sequenz
AKT3	138	AAAGGATGAAGTGGCACACA	TCGCCCCCATTAACATATTC
BCL6	147	TGTGCTTATCCACACTGGTGA	TGACGGAAATGCAGGTTACA
BMPR2	150	AATGTTGACAGGAGACCGTAAA	TCCAAGGAGCCTTTATATACTGC
CDC42BPA	118	TTTTGGGGAGGTTGCTGTAG	CCTTTCTTCACGAAAACATGC
DUSP5	150	CAAATGGATCCCTGTGGAAG	ATGCAGATGGTGGGTGAAC
IRS2	143	CCACCATCGTGAAAGAGTGA	CACAGTCATTGCTCAGATCCA
PLA2G4A	148	GGAAGAGAAAGAAATCGCTGAC	TTTTATCACATCAATGTTGTTCAGAG
SCHIP1	136	TGATCTTCTGCCACACATGC	CAAGCTTTCTATCTGGGAATGG

Die zur Normalisierung der Expression herangezogenen Haushaltsgene wurden alle in der Literatur bereits als endogene Kontrolle beschrieben oder durch Vorarbeiten in dieser Funktion verifiziert (Daten nicht gezeigt). Die Primer wurden von der Fa. Invitrogen Life Technologies, Grand Island, New York, USA und im Falle der Primer

für *ACTB* von der Fa. Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA bezogen. Die Messungen erfolgten mit RNA, die aus den Zellkulturexperimenten stammt (siehe unten).

Tabelle 6: Primer der Haushaltsgene / endogene Kontrollen

Abkürzungen:

[b] = Basen; *ACTB* = „beta actin"; *PPIA* = "cyclophillin A (peptidylprolylisomerase A)"; *PGK1* = "phosphoglyceratkinase 1"; *LMNB1* = „lamin B1"; A- = Adenin; C- = Cytosin; G- = Guanin; T- = Thymin

Gen	Produkt-größe [b]	Vorwärts Sequenz	Rückwärts Sequenz
ACTB	184	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC
PPIA	130	GCTCGTGCCGTTTTGCA	GCAAACAGCTCAAAGGAGACG
PGK 1	71	AAGTGAAGCTCGGAAAGCTTCTAT	TGGGAAAAGATGCTTCTGGG
LMNB1	90	CTGGAAATGTTTGCATCGAAGA	GCCTCCCATTGGTTGATCC

2.8 Zellkultur und Zelllinien

Die im Labor vorhandenen und zur Zellkultur verwendeten Leukämiezelllinien HEL und K-562 wachsen in Suspension. HEL ist eine humane Erythroleukämiezelllinie, K-562 eine Zelllinie humaner chronischer myeloischer Leukämie in der Blastenkrise. Die bei der qRT-PCR als Standard verwendete ME-I Zelllinie ist ebenfalls eine humane AML-Zelllinie. Sämtliche Arbeiten an den Zelllinien wurden nach Standardmethoden in EasyFlask-Zellkulturflaschen (Fa. VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland), an CleanAir DLF BSS6-Arbeitsbänken (Fa. J.H. Schrader, Göttingen, Deutschland) unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden mit Vollmedium aus 90% RPMI-1640, 10% FBS, 1% L-Glutamat, und 1% Penicillin/Streptomycin in einem Hera Cell 240-Brutschrank (Fa. Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA) bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert.

Die Zellen wurden gemäß ihres Wachstums und der dadurch erreichten Dichte alle 3 Tage zwischen 1:3 und 1:5 mit Vollmedium verdünnt, um einen Wachstumsstopp zu verhindern und die Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten. Die maximale Zelldichte für diese Zelllinie beträgt 1,5 x 10^6 Zellen/ml. Die Zellzahl wurde in erster Linie mit der Neubauerzählkammer bestimmt. Dabei wurde auf die Zählkammer ein Deckglas so aufgesetzt, dass Newtonsche-Ringe zu sehen waren, anschließend wurde ein definiertes Volumen Zellen 1:2 mit Trypanblau vermischt und unter das Deckglas pipettiert. Die Zellzahl aller 4 Großquadranten wurde ermittelt, der

Mittelwert, der sich daraus ergab, wurde dann noch mit dem Verdünnungsfaktor und 10000 multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu errechnen.

2.9 Zelltransfektion (Nukleofektion mittels AMAXA-Nucleofector)

Um die miR-181a in Zellen überexprimieren zu können, wurden pre-miR-181a (Fa. Ambion Inc., Austin, Californien, USA) in die Zellen eingebracht. Dabei wurde die AMAXA-Methode zur Zelltransfektion angewandt, um die miR-mimics in die Zellen zu schleusen.

Zunächst wurden die Zellen so verdünnt, dass eine Zellzahl von 2 x 10^6 Zellen/ml pro Transfektion erreicht wurde und dann bei 200 x g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium mit einer Absaugpumpe abgenommen, die Zellen mit 100 µl Nucleofector Solution resuspendiert und pre-miR-181a hinzu gegeben, so dass im Transfektionsmedium eine Endkonzentration von 30nM entstand. Diese Mischung wurde dann in das AMAXA-Gerät (Fa. Lonza, Basel, Schweiz) gestellt, das mittels Elektroschock den Übertritt der pre-miR-181a in die Zellen vermittelt. Die nun transfizierten Zellen wurden mit vorgewärmtem Medium in eine 12-well-Platte (Fa. BD Bioscience, San Jose, Kaliforenien, USA) überführt. Zur Erfolgskontrolle der Transfektion wurde in einer Reaktion GFP-RNA transfiziert, um anschließend durch eine Messung am Durchflusszytometer die Transfektionseffizienz zu bestimmen. Als weitere Positivkontrolle wurde außerdem die pre-miR-20a transfiziert, welche die mRNA Expression von *E2F1* negativ reguliert (O'Donell et al. 2005). So konnte mittels qRT-PCR die *E2F1*-Expression von nicht transfizierten Zellen und den mit pre-miR-20a transfizierten Zellen verglichen werden. Bei Erfolg der stattgehabten Transfektion sollte hierbei eine verminderte *E2F1*-Expression in den mit pre-miR-20a transfizierten Zellen beobachtet werden können.

Für die Messung der Auswirkung der miR-181a Überexpression auf die mittels integrativer Auswertung ermittelten putativen Kandidatengene wurden die Zellen jeweils 24 und 48 Stunden nach Transfektion geerntet, die RNA mittels des miRVana miRNA Isolation Kit® isoliert (siehe 2.3) und die Qualität der gewonnenen RNA durch das in 2.2.1 beschriebene Vorgehen mittels Nanodrop und Agarosegel überprüft. Die RNA wurde anschließend mittels Super Script III® in cDNA umgeschrieben (siehe 2.4.1) und die Expression der Kandidatengene dann mittels qRT-PCR nach der SYBR Green I® Methode unter Verwendung der Primer für *AKT3, BCL6, BMPR2, CDC42BPA, DUSP5, IRS2, PLA2G4A* und *SCHIP1* und der Haushaltsgene *ACTB,*

PPIA, PGK1 und *LMN1* gemessen. Die bei der Messung verwendeten Negativkontrollen waren Zellen, die mit einem leeren Vektor, d.h. einem Vektor ohne pre-miRs, transfiziert wurden.
In Analogie dazu wurden zur Ermittlung phänotypischer Unterschiede Zellen für Zellzahlmessungen und Apoptose-Assays (siehe unten) 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Transfektion geerntet. Zur Ermittlung der Zellzahl wurde ein Teil der Zellen abgefüllt. Zur Durchführung der Apoptose-Assays am Durchflusszytometer wurden die Zellen geerntet und entsprechend gefärbt (siehe 2.10.3).

2.10 Durchflusszytometrische Analysen und Zellzählung

Zur Beurteilung von Veränderungen im Proliferations- und Apoptoseverhalten der transfizierten Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen wurden Messungen am Durchflusszytometer FACS-Calibur (Fa. BD Bioscience, San Jose, Kalifornien, USA) sowie Zellzählungen durchgeführt.

2.10.1 Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte an einem automatischen Hämatologie-Analysator Sysmex XS 800 nach einem Standardprotokoll des Herstellers (Fa. Sysmex Coporation, Kobe, Japan).

2.10.2 Messung am Durchflusszytometer

Mittels der Durchflusszytometrie können Größe, Struktur, Komplexität und Fluoreszenzsignale von Zellen detektiert werden. Dazu werden die Zellen einzeln durch eine Kapillare angesaugt und passieren einen Laserstrahl. Daraufhin kommt es zu einer Emission optischer Signale seitens der Zelle, von denen auf Größe und Struktur der Zelle geschlossen werden kann. Durch vorherige Färbung der Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen kann die Anfärbung der einzelnen Zelle detektiert werden.

2.10.3 Färbung mit Annexin V und 7-Aminoactinomycin D (7-AAD)

Annexin V ist ein Protein, das spezifisch mit Phosphatidylserin reagiert. Bei vitalen Zellen mit intakter Zellmembran findet sich Phosphatidylserin vor allem an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran, so dass bei vitalen Zellen keine Anfärbung mit Annexin V möglich ist. Durch Zellsterben im Rahmen apoptotischer

Prozesse verlagert sich Phosphatidylserin an die Außenseite der Membran, so dass es dadurch zu einer Anfärbung der früh- und spätapoptotischen Zellen durch Annexin V kommt.

Der Zellfarbstoff 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) hingegen interkaliert mit der DNA der Zellen, er kann aber nur bei spätapoptotischen oder nekrotischen Zellen die Zellmembran durchdringen, so dass eine Anfärbung vitaler Zellen durch 7-AAD nicht möglich ist. Der gemeinsame Einsatz von Annexin V und 7-AAD ermöglicht als Apoptose-Assay die Differenzierung einzelner Apoptosestadien, welche die Zellen durchlaufen.

Zur Anfärbung werden die Zellen zunächst in FACS-Röhrchen (Fa. BD Bioscience, San Jose, Kalifornien, USA) mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), zusammengesetzt aus 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl und 12 mM Gesamtphosphat, verdünnt und anschließend bei 1200 rpm bei Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert. Anschließend wird 1 ml Annexin-Bindepuffer, bestehend aus 10mM Hepes, 140 mM NaCl und 2,5 mM $CaCl_2$, zugegeben und noch einmal bei 1200 rpm bei Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wird das Zellpellet in 1 ml Bindepuffer resuspendiert, um anschließend je 5 µl Annexin V und 7-AAD hinzu zu geben. Nach einer Inkubationszeit von ca. 20 min können die Proben am Durchflusszytometer gemessen werden.

Für die Auswertung der Messungen am Durchflusszytometer wurde die Software FlowJo Version 7.6.1 verwendet (Tree Star, Inc., Ashland, Oregon, USA).

2.11 Reagenzien und Chemikalien

Im Folgenden sind alle in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und Chemikalien und ihre Hersteller aufgeführt:

0,1 M DTT	Fa. Invitrogen Life Technologies, Grand Island, New York, USA
7-AAD	Fa. BD Bioscience, San Jose, Kalifornien, USA
10 x Blue Juice Gel Loading Buffer	Fa. Invitrogen Life Technologies, Grand Island, New York, USA
10 x RT-Buffer	Fa. Invitrogen Life Technologies, Grand Island, New York, USA
10 mM dNTP	Fa. Invitrogen Life Technologies, Grand Island, New York, USA
25 nM $MgCl_2$	Fa. Invitrogen Life Technologies, Grand Island, New York, USA
100 mM dNTP	Fa. Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
Acid-Phenol:Chloroform	Fa. Ambion Inc., Austin, Californien, USA
Agarose	Fa. Lonza, Basel, Schweiz
Annexin-Bindepuffer	Fa. BD Bioscience, San Jose, Kalifornien, USA

Annexin V	Fa. BD Bioscience, San Jose, Kalifornien, USA
Aqua bidestillata	Universitätsapotheke Ulm, Ulm/Donau, Deutschland
Chloroform	Fa. J.T.Baker, Deventer, Holland
DEPC-H_2O	Fa. Invitrogen Life Technologies, Grand Island, New York, USA
Ethanol	Fa. Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze, Deutschland
Ethidiumbromid	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
FBS	Fa. Biochrom AG, Berlin, Deutschland
GFP-DNA	Fa. Lonza, Basel, Schweiz
Homogenate Additive	Fa. Ambion Inc., Austin, Californien, USA
Isopropanol	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamat	Fa. Biochrom AG, Berlin, Deutschland
looped Primer	Fa. Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
Lysis/binding solution	Fa. Ambion Inc., Austin, Californien, USA
multiscribe RT	Fa. Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
Nucleofector Solution	Fa. Lonza, Basel, Schweiz
Nukleasefreies H_2O	Fa. Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
PBS	Fa. Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Fa. Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Pre-miR-181a	Fa. Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
random hexamers Primer	Fa. Invitrogen Life Technologies, Grand Island, New York, USA
RNAsefreies Wasser	Fa. Ambion Inc., Austin, Californien, USA
RNAse Inhibitor	Fa. Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
RNAse H	Fa. Invitrogen Life Technologies, Grand Island, New York, USA
RNAse out	Fa. Invitrogen Life Technologies, Grand Island, New York, USA
RT buffer	Fa. Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
RPMI-1640	Fa. Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Super Script III-RT	Fa. Invitrogen Life Technologies, Grand Island, New York, USA
SYBR Green Master Mix	Fa. Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
TAE	Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
TaqMan Master Mix	Fa. Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
Taq Man Sonden	Fa. Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
Trizolreagenz	Fa. Invitrogen Life Technologies, Grand Island, New York, USA
Trypanblau	Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Wash Solution 1	Fa. Ambion Inc., Austin, Californien, USA
Wash Solution 2/3	Fa. Ambion Inc., Austin, Californien, USA

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse aus Vorarbeiten

Um eine verbesserte Risikostratifizierung der AML-Patienten mit normalem Karyotyp (CN-AML) zu erreichen, werden neben dem Genmutationsstatus auch veränderte miR-Expressionsmuster als prognostischer Faktor in Erwägung gezogen. Von Marcucci et al. wurde die miR-181a als unabhängiger prognostischer Marker postuliert (Marcucci et al. 2008b).

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten DNA Microarray-basierte miR-181a Messungen (unpublizierte Daten) keinen signifikanten Zusammenhang zwischen miR-181a Expression und dem Gesamtüberleben (OS) (Abbildung 6) bzw. dem ereignisfreien Überleben (EFS) (Abbildung 7) aufzeigen. Bei Fällen mit in Bezug zur medianen miR-181a Expression erhöhten miR-181a Expressionswerten zeigte sich kein Vorteil für das Gesamtüberleben (p-Wert = 0,3139) und auch kein signifikanter Unterschied für das ereignisfreie Überleben (p-Wert = 0,2346), wobei jedoch ein entsprechender Trend vermutet werden kann.

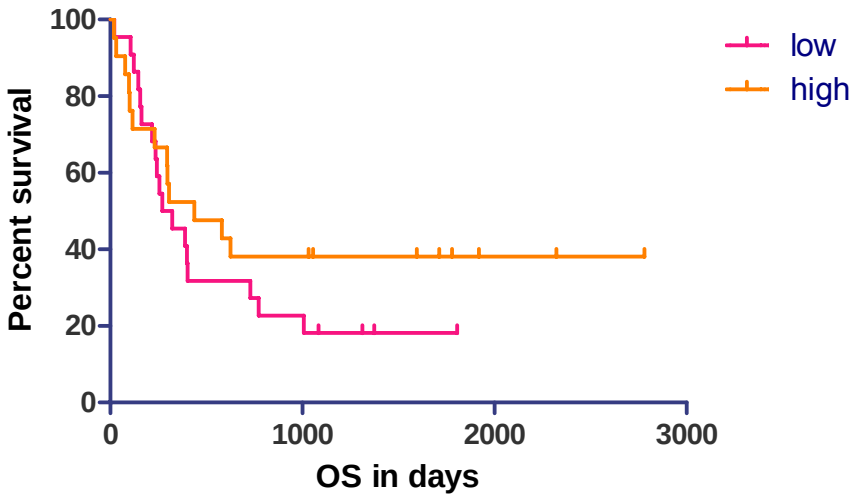


Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der miR-181a Expression (AMLSG-Studienfälle)

Es zeigt sich kein Überlebensvorteil der Fälle mit erhöhter (high, orange) miR-181a Expression im Vergleich zu den Fällen mit niedriger (low, rot) miR-181a Expression (log rank Statistik, p-Wert = 0,3139).

Abkürzungen:

OS = Gesamtüberleben in Tagen; miR-181a = microRNA 181a; AML = akute myeloische Leukämie; AMLSG = AML Studiengruppe

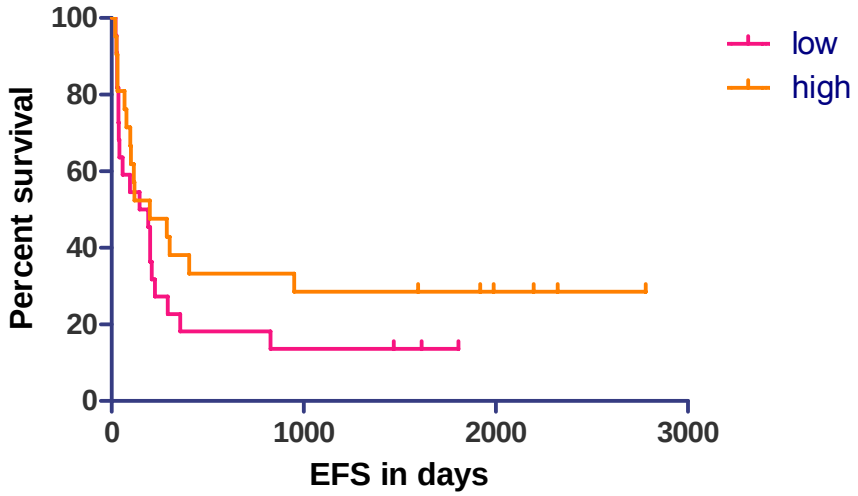


Abbildung 7: **Kaplan-Meier-Kurve des ereignisfreien Überlebens in Abhängigkeit von der miR-181a Expression**
(AMLSG-Studienfälle)

Es zeigt sich kein Überlebensvorteil der Fälle mit erhöhter (high, orange) miR-181a Expression im Vergleich zu den Fällen mit niedriger (low, rot) miR-181a Expression (log rank Statistik, p-Wert = 0,2346).

Abkürzungen:

EFS = ereignisfreies Überleben in Tagen; miR-181a = microRNA 181a; AML = akute myeloische Leukämie; AMLSG = AML Studiengruppe

Ferner wurde in der Arbeit von Marcucci et al. nicht im Detail untersucht, ob es einen signifikanten Zusammenhang zwischen der miR-181a Expression und prognostisch relevanten Genmutationen geben könnte. Um miR-181a als neuen prognostisch relevanten Marker definieren zu können, müssen Genmutationen, die mit einem Vorteil im Gesamtüberleben und der ereignisfreien Zeit assoziiert sind, im Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang mit einer veränderten miR-181a Expression betrachtet werden. Hier kommen eine *CEBPA*-Mutation sowie der prognostisch günstige Genotyp in Konstellation einer *NPM1*-Mutation und einem nichtmutierten *FLT3*-Wildtyp in Frage (Schlenk et al. 2008).

Um die Annahme, die miR-181a Expression könne als unabhängiger prognostischer Marker bei AML-Fällen mit normalem Karyotyp fungieren, weiter zu evaluieren, wurde in der vorliegenden Arbeit in insgesamt 130 molekular gut charakterisierten CN-AML-Fällen die miR-181a Expression mittels qRT-PCR gemessen und anschließend mit vorliegenden Daten bezüglich Genmutationsstatus und klinischen Daten korreliert.

3.2 Ergebnisse der Messung der AMLSG HD98A Studienfälle (n=83)

3.2.1 qRT-PCR Messungen

RNA-Patientenproben von 83 AMLSG HD98A Studienfällen wurden anhand ihrer RNA-Qualität und der vorliegenden Menge ausgewählt und mittels der TaqMan®-qRT-PCR wurde die miR-181a Expression in diesen Proben bestimmt. Die miR-181a Expression wurde jeweils im Triplikat gemessen, wobei daraus jeweils der Mittelwert als Ergebnis verwertet wurde. Zur Quantifizierung wurde für jede Sonde eine Standardkurve gemessen. Ausschlaggebend für die Wahl der als Standard geeigneten Zelllinie war die jeweilige miR-181a Expression. Für die Zelllinie ME-I zeigte sich hierbei die höchste Konzentration. Zur Normalisierung wurde bei jeder Probe eine endogene Kontrolle gemessen, wobei auch hierzu mögliche endogene Kontrollen im Vorfeld getestet wurden. Schließlich zeigte die, in Vorarbeiten als endogene Kontrolle bewährte miR-374 eine gleichmäßige Expression, und wurde als endogene Kontrolle eingesetzt. Durch den Quotienten aus den miR-181a Messwerten und den miR-374 Daten konnten etwaige Ladungsfehler ausgeglichen werden und somit eine Normalisierung der Werte erfolgen (siehe Tabelle 7).

Die Einteilung in zwei Subgruppen mit je erhöhter bzw. erniedrigter miR-181a Konzentration erfolgte anhand der medianen miR-181a Expression (Dichotomisierung am Median).

Tabelle 7: Übersicht der qRT-PCR Ergebnisse der n=83 AMLSG HD98A-Fälle

Abkürzungen:

ID = Proben-Identifikationsnummer; Qty mean = mittlere Quantität; miR-181a = microRNA 181a; miR-374 = microRNA 374 (endogene Kontrolle); n = Anzahl; AMLSG = AML Studiengruppe; qRT-PCR = quantitative Real-Time Polymerasekettenverfahren; AML = akute myeloische Leukämie

ID	Qty mean miR-181a	Qty mean miR-374	Qty mean miR-181a / 374
5	1079574	8811785	0.1225
39	349266	17717052	0.0197
52	956761	8851713	0.1081
55	970043	7000336	0.1386
91	227879	5223911	0.0436
96	76336	742937	0.1027
111	107915	6650122	0.0162
113	4609663	11369236	0.4055
117	1512995	1953468	0.7745
120	4223218	12097344	0.3491
122	927881	4197687	0.2210
136	552428	3861931	0.1430
147	5244425	11788761	0.4449
154	629745	3899677	0.1615
162	715997	4396020	0.1629
179	1225315	17694354	0.0692
181	872267	16307893	0.0535
212	654797	9647702	0.0679
218	1010943	11889004	0.0850
231	380010	6825918	0.0557
248	111454	2031475	0.0549
263	905687	4107077	0.2205
275	1223314	6910312	0.1770
276	1557487	9207693	0.1692
284	97495	1931365	0.0505
299	918507	4077058	0.2253
302	2541474	7868451	0.3230
355	2109104	11518593	0.1831
357	89170	1059316	0.0842
358	380831	171279	2.2234
359	138278	150271	0.9202
364	196429	4366518	0.0450
366	571059	11096822	0.0515
448	3382616	2184610	1.5484
453	502688	1066363	0.4714
480	919051	6740734	0.1363
484	1781201	4179631	0.4262
504	678666	3866292	0.1755
508	3392293	5025742	0.6750
541	201154	4789210	0.0420
543	946815	4972245	0.1904
561	1788968	16668973	0.1073
574	479663	9129757	0.0525
595	235574	5348912	0.0440
596	1304704	6669526	0.1956

608	382706	3863555	0.0991
611	667618	3973228	0.1680
615	619411	7427362	0.0834
619	398992	4951879	0.0806
634	588180	9222137	0.0638
684	151850	8221763	0.0185
685	312894	50875	6.1502
702	1307419	5148886	0.2539
703	698860	5085898	0.1374
720	462181	3397242	0.1360
729	942557	8608047	0.1095
741	2007287	2464224	0.8146
752	853511	6017951	0.1418
759	183115	7332145	0.0250
765	1053688	3618180	0.2912
771	540440	7317976	0.0739
775	539816	6646054	0.0812
781	725653	2084987	0.3480
783	3057308	15093332	0.2026
785	681942	7052812	0.0967
790	1232860	8563399	0.1440
804	473629	2690596.2	0.1760
815	312415	5247408.5	0.0595
826	967221	2733605.2	0.3538
829	1767438	543602.25	3.2513
847	275036	2602235.2	0.1057
855	354777	2724375.8	0.1302
862	286584	9931492	0.0289
863	231039	15380741	0.0150
867	426194	6273409	0.0679
868	795667	241940	3.2887
883	3713753	6906476	0.5377
887	1746466	7943189	0.2199
890	234473	4408148	0.0532
912	136886	6216527	0.0220
921	475473	9782792	0.0486
934	534338	4574903	0.1168
950	571746	4719338	0.1211

3.2.2 Korrelation der miR-181a Expression mit dem Gesamtüberleben bzw. dem ereignisfreien Überleben der AMLSG HD98A-Studienfälle

Die anhand der medianen miR-181a Expression eingeteilten Subgruppen wurden mit bereits vorliegenden Daten zum Gesamtüberleben und der ereignisfreien Zeit verglichen. Hier zeigte sich wie auch bei den DNA Microarray-basierten Messungen bei der sensitiveren qRT-PCR ebenfalls kein Zusammenhang zwischen erhöhter miR-181a Expression und einem Vorteil im Überleben (siehe Abbildung 8). Auch bezüglich der ereignisfreien Zeit ließ sich kein Zusammenhang, wohl aber ein starker Trend feststellen (siehe Abbildung 9).

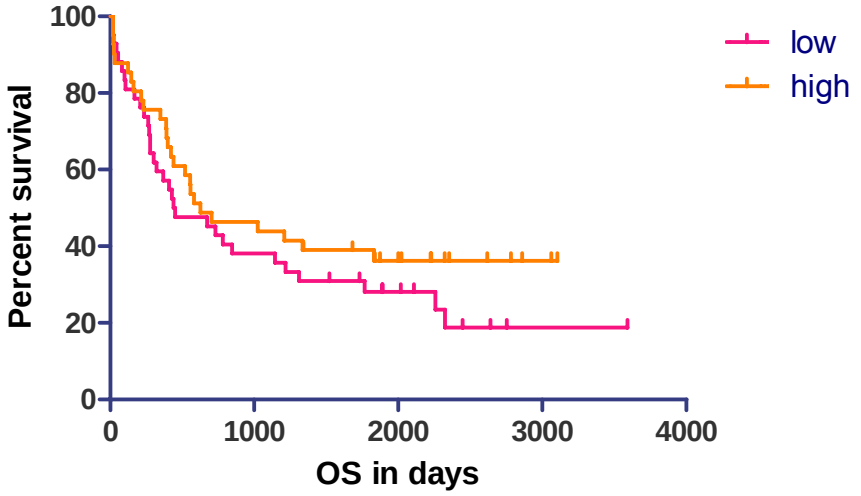


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der miR-181a Expression (n = 83 AMLSG HD98A)

Die Subgruppe, die eine erhöhte miR-181a Expression (high, orange) zeigt, weist im Vergleich zur Subgruppe mit einer erniedrigten miR-181a Expression (low, rot) keinen Vorteil im Gesamtüberleben auf (log rank Statistik, p-Wert = 0,2677).

Abkürzungen:

OS = Gesamtüberleben in Tagen; AMLSG = AML Studiengruppe; AML = akute myeloische Leukämie; n = Anzahl; miR-181a = microRNA 181a

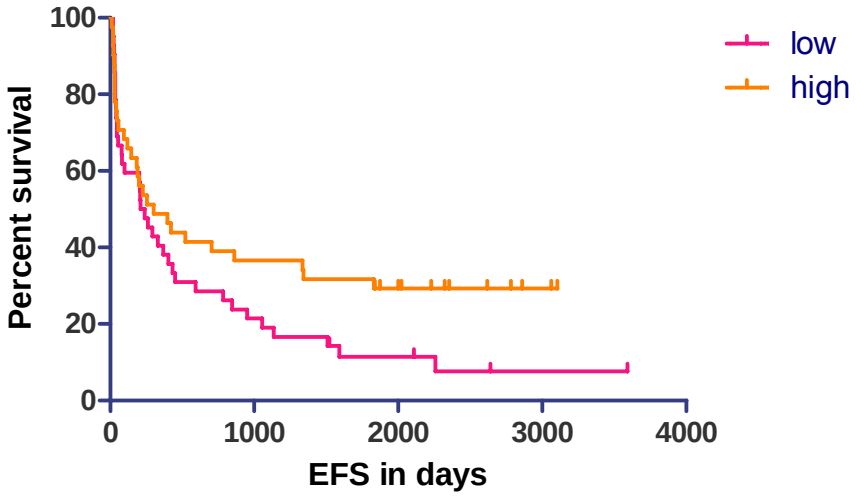


Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve des ereignisfreien Überlebens in Abhängigkeit von der miR-181a Expression

(n = 83 AMLSG HD 98A)

Die Subgruppe, die eine erhöhte miR-181a Expression (high, orange) zeigt, weist im Vergleich zur Subgruppe mit einer erniedrigten miR-181a Expression (low, rot) zwar keinen signifikanten Vorteil im ereignisfreien Überleben auf, es zeigt sich jedoch ein starker Trend (log rank Statistik, P-Wert = 0,0899).

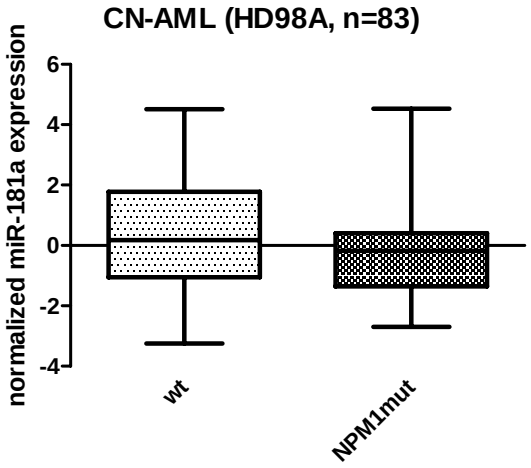
Abkürzungen:

EFS = ereignisfreies Überleben in Tagen; AMLSG = AML Studiengruppe; AML = akute myeloische Leukämie; n = Anzahl; miR-181a = microRNA 181a

3.2.3 Korrelation der miR-181a Expression mit dem Genmutationsstatus der AMLSG HD98A-Studienfälle

Um zu überprüfen, ob die miR-181a Expression mit dem Mutationsstatus von prognostisch relevanten Genen korreliert (Schlenk et al. 2008), wurden die miR-181a Expressionsdaten mit den vorliegenden molekulargenetischen Informationen für diese Proben korreliert. Dabei wurde das Augenmerk v.a. auf prognostisch günstige Mutationen, wie eine *CEBPA*-Mutation oder eine Kombination aus einer *FLT3*-ITD-Mutation und einem unmutierten *NPM1*-Wildtyp, gerichtet.

So zeigte sich für Mutationen im *NPM1*-Gen und auch für *FLT3*-ITD-Mutationen keine statistisch signifikante Korrelation mit höheren miR-181a Expressionswerten (siehe Abbildungen 10 und 11). Es zeigte sich jedoch eine statistisch signifikante Korrelation von miR-181a Expressionswerten und dem Vorhandensein von *CEBPA*-Mutationen (siehe Abbildung 12; p-Wert = 0,0013, t-Test). So wiesen die Fälle mit einer *CEBPA*-Mutation eine signifikante Erhöhung der miR-181a Expression im Vergleich zu den in *CEBPA* unmutierten Fällen auf.

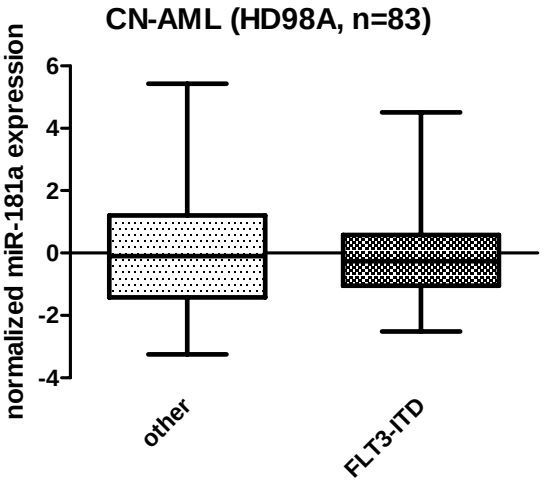


<u>Abbildung 10</u>: Korrelation von miR-181a Expression und *NPM1* Mutationsstatus (n = 83 AMLSG HD 98A)

Es zeigt sich kein Unterschied zwischen *NPM1* mutierten und unmutierte (wt) Fällen hinsichtlich der miR-181a Expression (p-Wert = nicht signifikant, t-test).

Abkürzungen:

CN-AML = AML-Fälle mit normalem Karyotyp; n = Anzahl; AML = akute myeloische Leukämie; AMLSG = AML Studiengruppe; wt = wildtype (unmutiert); *NPM1* = „nucleophosmin 1"; miR-181a = microRNA 181a

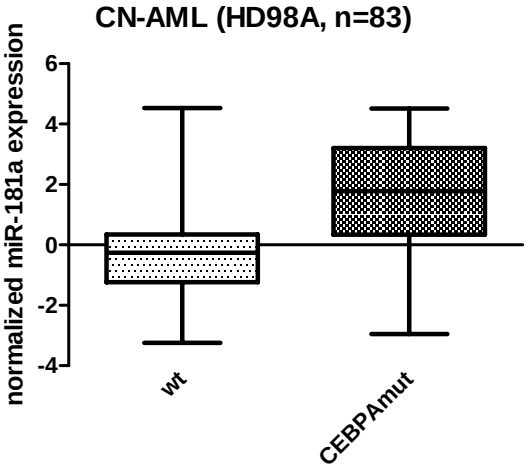


<u>Abbildung 11</u>: Korrelation von miR-181a Expression und *FLT3*-ITD Mutationsstatus (n = 83 AMLSG HD 98A)

Es zeigt sich kein Unterschied zwischen *FLT3*-ITD mutierten und unmutierte oder anders mutierten (others) Fällen hinsichtlich der miR-181a Expression (P-Wert = nicht signifikant, t-test).

Abkürzungen:

CN-AML = AML-Fälle mit normalem Karyotyp; AML = akute myeloische Leukämie; AMLSG = AML Studiengruppe; n = Anzahl; other = Wildtypen (unmutiert) oder andere Mutation; *FLT3*-ITD = „internal tandem duplication" im „fms-related tyrosinkinase 3-Gen"; miR-181a = microRNA 181a



<u>Abbildung 12</u>: Korrelation von miR-181a Expression und *CEBPA* Mutationsstatus (n = 83 AMLSG HD98A)

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen *CEBPA*-mutierten und unmutierte Fällen hinsichtlich der miR-181a Expression. Die miR-181a Expression ist in Fällen mit vorliegender *CEBPA*-Mutation signifikant erhöht. (P-Wert = 0,0013, t-test).

Abkürzungen:

CN-AML = AML-Fälle mit normalem Karyotyp; AML = akute myeloische Leukämie; AMLSG = AML Studiengruppe; n = Anzahl; wt = unmutiert; *CEBPA* = „CCAAT/enhancer binding protein alpha"; miR-181a = microRNA 181a

Um die vermeintliche Abhängigkeit der miR-181a Expression vom *CEBPA*-Mutationsstatus weiter zu evaluieren, wurde die Korrelation der miR-181a Expression mit dem ereignisfreien Überleben noch einmal bestimmt, in diesem Fall jedoch unter Ausschluss der in *CEBPA* mutierten Fälle. Der Vorteil der Subgruppe mit erhöhter miR-181a Expression gegenüber der Subgruppe mit erniedrigter miR-181a Expression war dabei nicht mehr sichtbar (Abbildung 13 im Vergleich zu Abbildung 9).

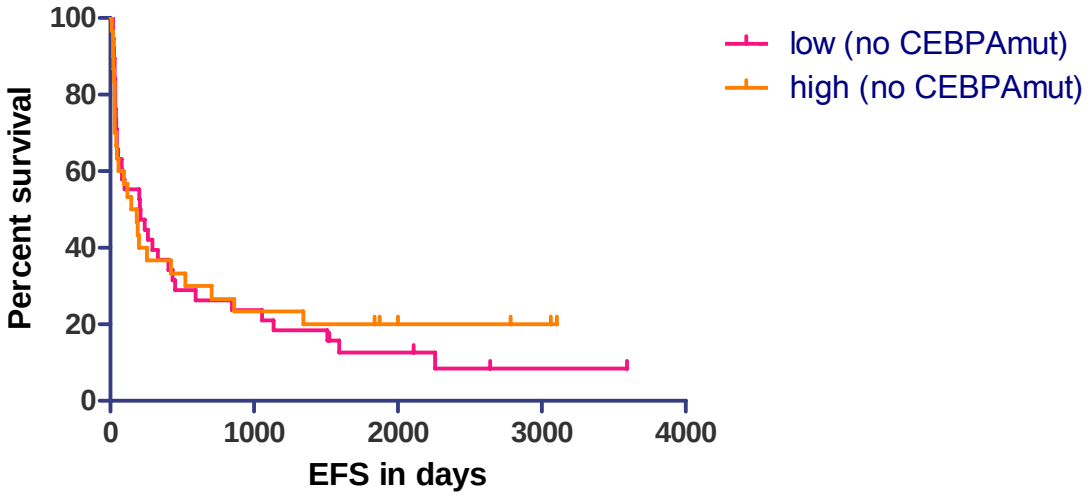


Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurve des ereignisfreien Überlebens in Abhängigkeit von der miR-181a Expression
(n = 83 AMLSG HD 98A)

Es zeigt sich nach Ausschluss aller in *CEBPA*-mutierten Fälle kein Überlebensvorteil der Fälle mit erhöhter (high, orange) miR-181a Expression im Vergleich zu den Fällen mit niedriger (low, rot) miR-181a Expression (log rank Statistik, p-Wert = 0,2677).

Abkürzungen:

EFS = ereignisfreies Überleben in Tagen; CEBPAmut = Mutation im *CEBPA*-Gen; *CEBPA* = „CCAAT/enhancer binding protein alpha"; AML = akute myeloische Leukämie; AMLSG = AML Studiengruppe; n = Anzahl

3.3 Ergebnisse der Messung der AMLSG 07-04 Studienfälle (n=47)

3.3.1 qRT-PCR Messungen

Um die signifikante Korrelation einer erhöhten miR-181a Expression und dem Vorliegen einer *CEBPA*-Mutation zu bestätigen, wurden aus einer unabhängigen AMLSG Studie 47 weitere CN-AML-Fälle ausgewählt und mittels TaqMan®-qRT-PCR die miR-181a Expression ermittelt. Auch hierbei diente die Zelllinie ME-I als

Standard und die miR-374 als endogene Kontrolle zur Normalisierung (für Details der Durchführung siehe 3.2.1).

Tabelle 8: Übersicht der qRT-PCR Ergebnisse der n=47 AMLSG 07-04-Fälle

Abkürzungen:

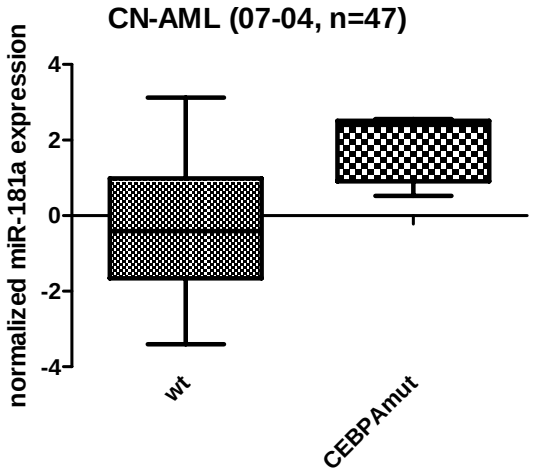
ID = Proben-Identifikationsnummer; Qty mean = mittlere Quantität; miR-181a = microRNA 181a; miR-374 = microRNA 374 (endogene Kontrolle); n = Anzahl; AMLSG = AML-Studiengruppe; qRT-PCR = quantitative Real-Time Polymerasekettenverfahren; AML = akute myeloische Leukämie

ID	Qty mean miR-181a	Qty mean miR-374	Qty mean 181a / 374
1	220986	413646	0.5342391
2	56441	2334757	0.0241741
6	1363819	11309017	0.1205958
10	490774	6520648	0.0752646
29	186006	1033190	0.1800308
31	3413641	8535822	0.3999194
33	903219	12390215	0.0728977
34	411480	4177331	0.0985031
48	2445090	4698239	0.5204269
61	190424	13471168	0.0141357
66	229115	4257628	0.0538129
68	2029822	8148467	0.2491048
78	60954	2734443	0.0222913
80	587568	9153831	0.0641882
81	58569	1943824	0.0301306
86	350408	4878059	0.0718335
103	97195	1045027	0.0930071
105	116809	4990260	0.0234073
107	23977	1400382	0.0171215
128	112969	1158787	0.0974886
134	120901	3848663	0.0314138
142	98827	1990019	0.0496616
143	305368	13281364	0.0229922
153	389398	1807708	0.2154100
168	386349	573279	0.6739283
192	128246	1860314	0.0689381
195	207860	1571108	0.1323017
22	216030	3009827	0.0717749
99	15218	1635290	0.0093062
102	84435	597938	0.1412098
197	22033	1143598	0.0192663
198	74729	1398753	0.0534258
217	135629	158273	0.8569281
223	82044	2663889	0.0307987
232	127031	1125259	0.1128905
234	166117	402247	0.4129716
235	93750	860761	0.1089153
248	95362	506165	0.1884014
249	365009	1233289	0.2959640
250	679704	2949274	0.2304649
252	96418	425469	0.2266151
255	53072	433541	0.1224149
259	122479	225853	0.5422955

268	410753	1695933	0.2421990
275	296278	5418994	0.0546739
337	1627051	2808453	0.5793406
340	96057	1399540	0.0686349

3.3.2 Korrelation der miR-181a Expression mit dem Genmutationsstatus der AMLSG 07-04 Studienfälle

In Analogie zu den AMLSG HD98A Fällen, zeigte sich eine sehr signifikante Korrelation (p-Wert = 0,008) zwischen einer *CEBPA*-Mutation und einer erhöhten miR-181a Expression (siehe Abbildung 14).



<u>Abbildung 14</u>: Korrelation von miR-181a Expression und *CEBPA* Mutationsstatus (n = 47 AMLSG 07-04)

Es zeigt sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen *CEBPA*-mutierten und unmutierte Fällen hinsichtlich der miR-181a Expression. Die miR-181a Expression ist in Fällen mit vorliegender *CEBPA*-Mutation signifikant erhöht. (p-Wert = 0,008, t-test).

Abkürzungen:

CN-AML = AML-Fälle mit normalem Karyotyp; AML = akute myeloische Leukämie; AMLSG = AML Studiengruppe ; n = Anzahl; wt = unmutiert; *CEBPA* = „CCAAT/enhancer binding protein alpha"; CEBPAmut = Mutation in CEBPA; miR-181a = microRNA 181a

3.4 Evaluation der miR-181a Überexpression im Zelllinienmodell

Die Beobachtung einer signifikanten Korrelation der miR-181a Expression mit *CEBPA*-Mutationen lässt die Frage aufkommen, ob die miR-181a Expression hier nur einen „unbeteiligten“ Surrogatmarker darstellt, oder ob die miR-181a Expression in der Pathogenese der CN-AML mit *CEBPA* Mutationen eine Rolle spielt. Um diese Frage weiter abzuklären, wurde die Auswirkung einer miR-181a Überexpression in Leukämiezelllinienmodellen weiter untersucht. Dazu wurden zum einen die Auswirkung einer miR-181a Überexpression auf Zellebene, d.h. auf Apoptose- und Proliferationsverhalten, untersucht, zum anderen wurden auf Genebene vermeintliche Zielgene der miR-181a gesucht und überprüft.

3.4.1 Überexpression der pre-miR-181a in den Leukämiezelllinen HEL und K562 mittels Transfektion durch Elektroporation

Um einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten miR-181a Expression und den vermeintlichen Zielgenen, einem veränderten Zellwachstum oder einem veränderten Apoptoseverhalten der Zellen aufzeigen zu können, wurde eine Zelltransfektion mit pre-miR-181a in zwei Zelllinien, HEL und K562, durchgeführt (Protokoll siehe 2.9).

3.4.2 Effizienz der Transfektion

Als Positivkontrolle der Transfektion wurde pre-miR-20a in die Zellen transfiziert, da miR-20a die *E2F1*-Expression negativ reguliert (O’Donnell et al. 2005). Anschließend wurde die *E2F1*-Expression mittels qRT-PCR in den miR-20a transfizierten Zellen gemessen und mit der Expression in den Zellen verglichen, welche mit einem leeren Vektor (Negativkontrolle) transfiziert wurden. Dabei zeigte sich an beiden gemessenen Zeitpunkten eine deutlich herabgesetzte *E2F1*-Expression in den miR-20a transfizierten Zellen im Vergleich zu den Negaitvkontrollen (siehe Abbildung 15), was den Erfolg der Transfektion zeigt.

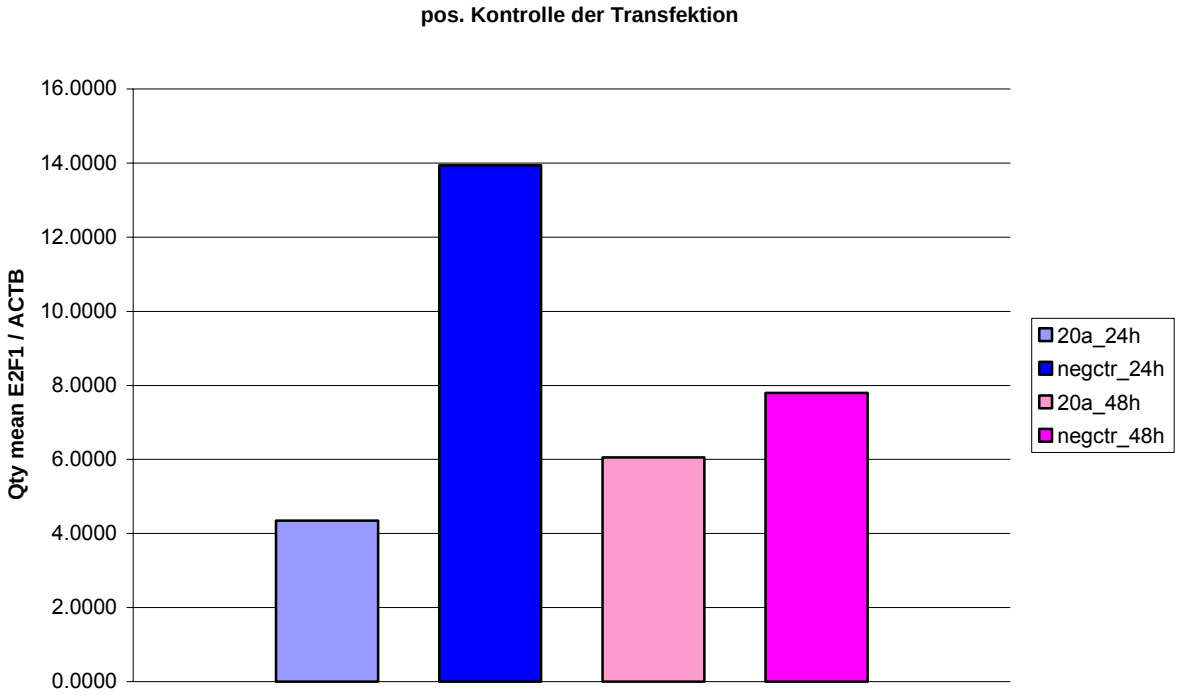


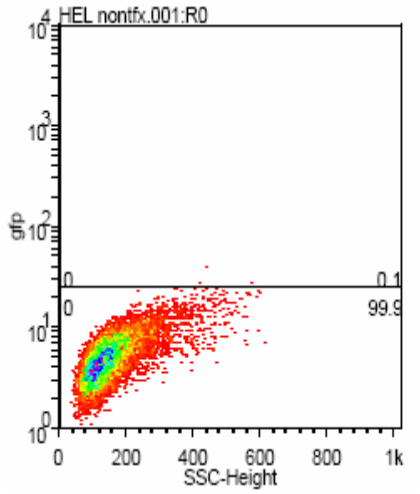
Abbildung 15: ***E2F1*-Expression in miR-20a transfizierten HEL-Zellen im Vergleich zu Negativkontrollen**

Zu beiden gemessenen Zeitpunkten, 24 h und 48 h nach Transfektion, zeigt sich bei den miR-20a transfizierten Zellen eine deutlich verminderte *E2F1*-Expression im Vergleich zu der Negatikontrolle, was den Erfolg der Transfektion zeigt.

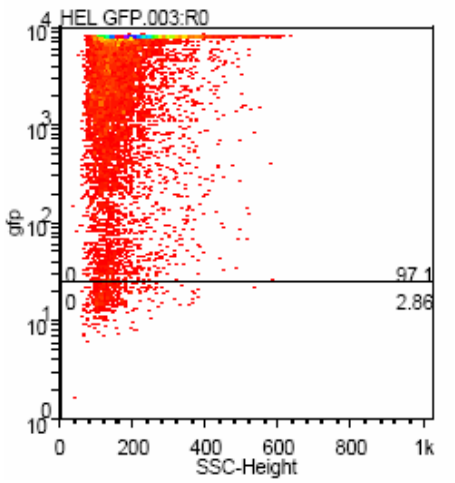
Abkürzungen:

E2F1 = „EF transcription factor 1"; 20a_24h/_48h = *E2F1*- Expression in miR20a transfizierten Zellen nach 24 / 48 Stunden; negctr_24h / 48h = *E2F1*-Expression in Negativkontrollen nach 24 / 48 Stunden; Qty mean = mittlere Quantität; *ACTB* = „Actin beta"; HEL = humane Erythroleukämiezelllinie

Als weitere Kontrolle für den Erfolg der Transfektion sowie als Maß für die Transfektionseffizienz wurde pmax-GFP transfiziert und anschließend durchflusszytometrisch gemessen (siehe Abbildung 16).



16.1



16.2

Abbildung 16: **GFP-FACS**

16.1: Nicht transfizierte Zellen zeigen lediglich zu 0,1% eine GFP-Anfärbung.

16.2: Die GFP-transfizierten Zellen zeigen zu 97,1% eine GFP-Anfärbung, was einer Transfektionseffizienz von 97,1% entspricht

Abkürzungen:

HEL = humane Erythroleukämiezelllinie; nontfx = nicht transfiziert; gfp = „grün fluoreszierendes Protein"; SSC-Height = Seitwärtsstreulicht

3.5 Zellzählung zur Überprüfung der Auswirkung der miR-181a Überexpression auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien

Durch Zellzählung wurde das Proliferationsverhalten der miR-181a überexprimierten Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle, den mit einem Leervektor transfizierten Zellen, ermittelt.

Dabei ergab sich weder für HEL-Zellen (siehe Abbildung 17) noch für K562-Zellen (siehe Abbildung 18) ein eindeutiger Effekt, wobei für HEL nach 48h die Zellzahl leicht erhöht war.

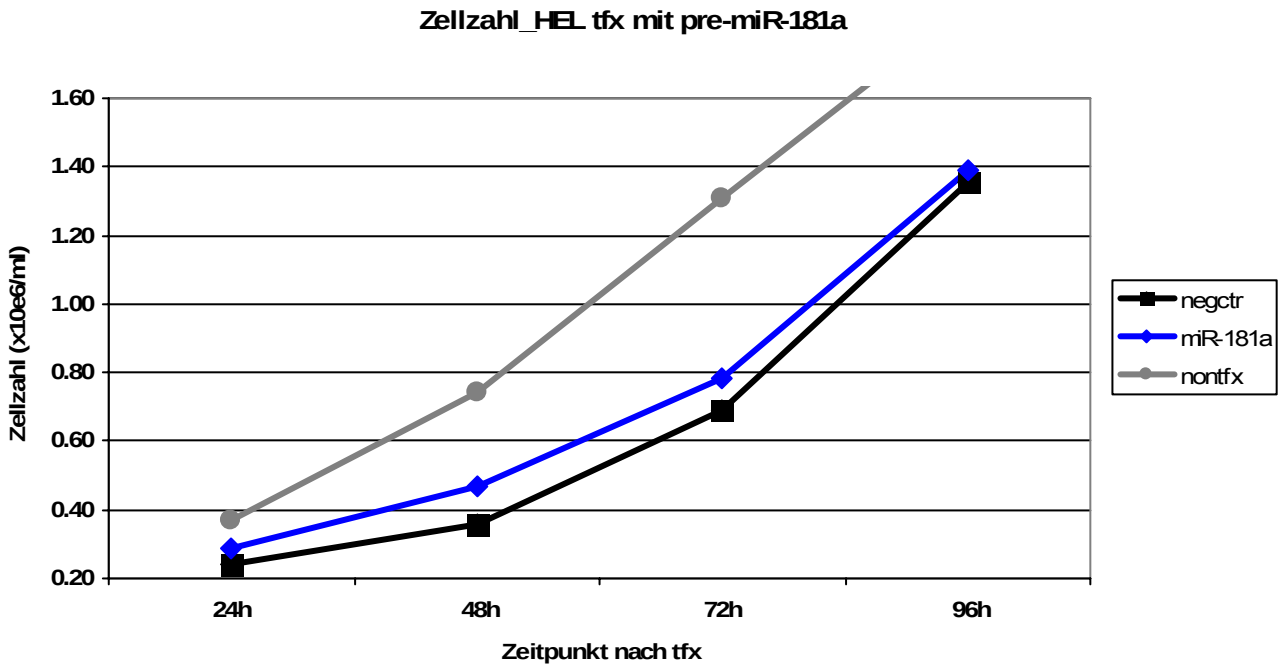


Abbildung 17: HEL-Zellzahl an 4 Zeitpunkten nach Transfektion

Die Zellzahl der mit pre-miR-181a transfizierten Zellen entwickelt sich beinahe parallel zur Zellzahl der Negativkontrolle. Es ist kein eindeutiger Vorteil oder Nachteil im Proliferationsverhalten zu erkennen. Lediglich 48 Stunden nach Transfektion zeigen die pre-miR-181a transfizierten Zellen eine höhere Zellzahl, also ein leicht verstärktes Proliferationsverhalten im Vergleich zur Negativkontrolle.

Abkürzungen:

HEL = humane Erythroleukämiezelllinie; tfx = transfiziert; pre-miR-181a = „miR-181a-mimics“; negctr = Negativkontrolle; nontfx = nicht transfizierte Zellen; miR-181a = microRNA 181a

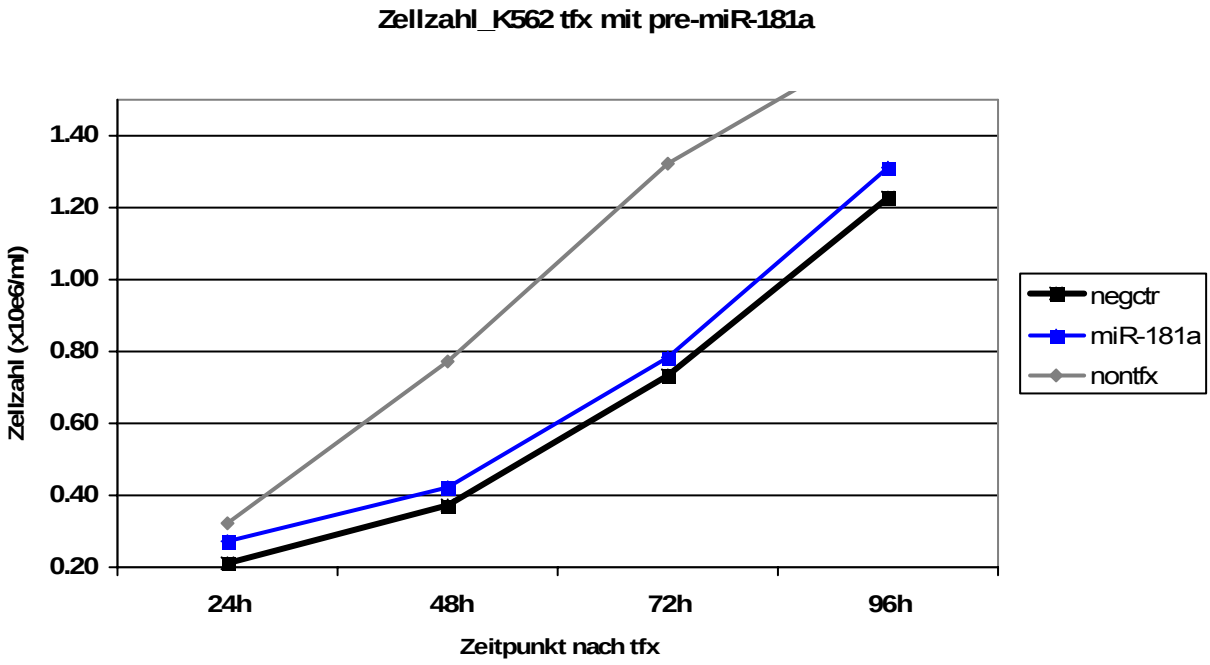


Abbildung 18: **K562-Zellzahl an 4 Zeitpunkten nach Transfektion**

Die Zellzahl der pre-miR-181a transfizierten Zellen entwickelt sich beinahe parallel zur Zellzahl der Negativkontrolle. Es ist kein Vorteil oder Nachteil im Proliferationsverhalten erkennbar.

Abkürzungen:

K562 = Zellinie einer humanen chronisch myeloischen Leukämie in der Blastenkrise; tfx = transfiziert; pre-miR-181a = „miR-181a-mimics"; negctr = Negativkontrolle; nontfx = nicht transfizierte Zellen; miR-181a = microRNA 181a

3.6 Durchflusszytometrische Analysen der Auswirkung der miR-181a Überexpression auf das Apoptoseverhalten der Zelllinien

Die Auswirkung der miR-181a Überexpression auf das Apoptoseverhalten der Zellen wurde mit Annexin V / 7-AAD-Färbung und anschließenden durchflusszytometrischen Analysen untersucht. Dazu wurden jeweils die mit pre-miR-181a transfizierten Zellen mit leer transfizierten Zellen (Negativkontrolle) und nicht transfizierten Zellen verglichen.

Durch das spezifische Färbeverhalten von Annexin V für früh- und spätapoptotische Zellen und von 7-AAD für spätapoptotische Zellen konnte der Anteil der viablen Zellen den Zellen in Früh- bzw. Spätapoptose gegenübergestellt werden.

Für HEL-Zellen zeigte sich im Vergleich zur Negativkontrolle nach 48h ein kleiner Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen bei den mit pre-miR-181a transfizierten Zellen, die weniger Apoptose zeigten (siehe Abbildung 19 und 20).

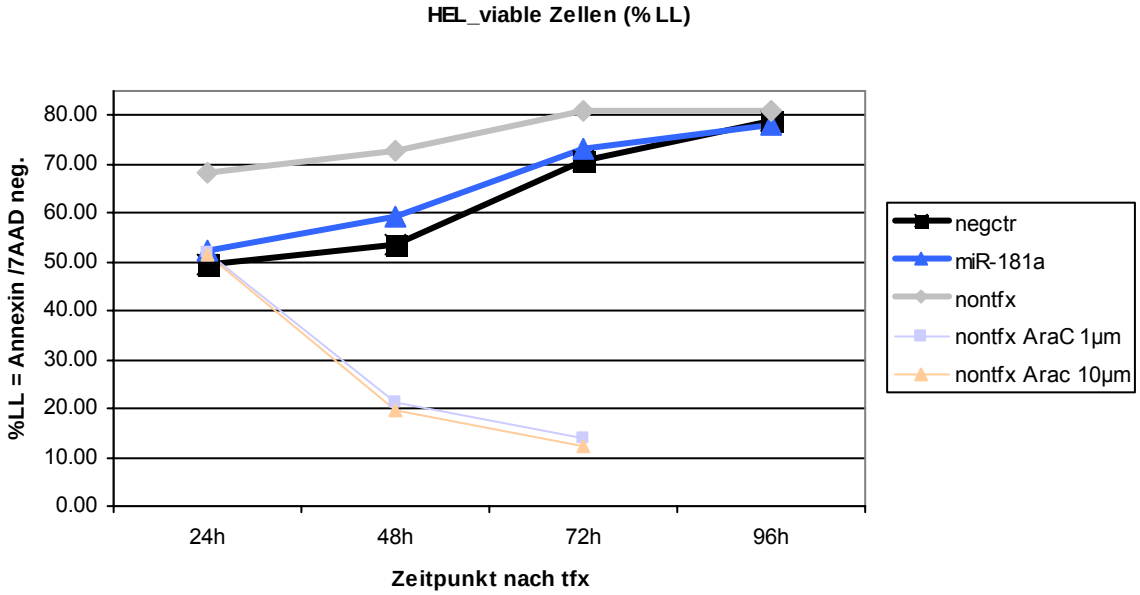


Abbildung 19: Anteil der viablen Zellen zu 4 Zeitpunkten nach Transfektion

Die mit pre-miR-181a transfizierte Zellen zeigen gegenüber den leer transfizierten Zellen (Negativkontrolle) einen geringfügig höheren Anteil an viablen Zellen, also eine geringfügig verminderte Apoptoserate. Die Behandlung mit AraC ergibt ein erwartetes Absinken der Zahl viabler Zellen.

Abkürzungen:

Annexin / 7AAD neg. = % LL = keine Anfärbung durch Annexin / 7AAD; HEL = humane Erythroleukämiezelllinie; tfx = transfiziert; pre-miR-181a = „miR-181a-mimics“; miR-181a = microRNA 181a; negctr = Negativkontrolle; nontfx = nicht transfizierte Zellen; AraC = Cytosin-Arabinosid

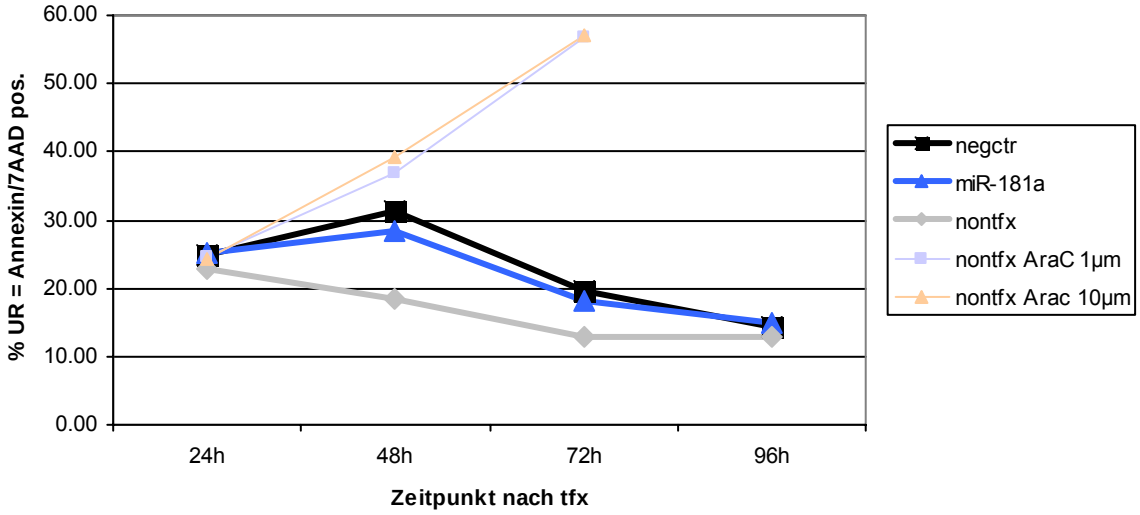


Abbildung 20: Anteil spätapoptotischer HEL-Zellen zu 4 Zeitpunkten nach Transfektion

Die mit pre-miR-181a transfizierten Zellen zeigen geringfügig weniger Apoptose im Vergleich zu den leer-transfizierten Zellen (Negativkontrolle). Die Behandlung der Zellen mit AraC ergibt ein erwartetes stark vermehrtes apoptotisches Verhalten.

Abkürzungen:

Annexin / 7AAD pos. = % UR = Anfärbung durch Annexin und durch 7AAD; HEL = humane Erythroleukämiezelllinie; tfx = transfiziert; pre-miR-181a = „miR-181a-mimics“; negctr = Negativkontrolle; nontfx = nicht transfizierte Zellen; AraC = Cytosin-Arabinosid; ; miR-181a = microRNA 181a

Für K562-Zellen ergab sich hingegen kein eindeutiger Effekt bei den pre-miR-181a transfizierten Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (siehe Abbildungen 21 und 22).

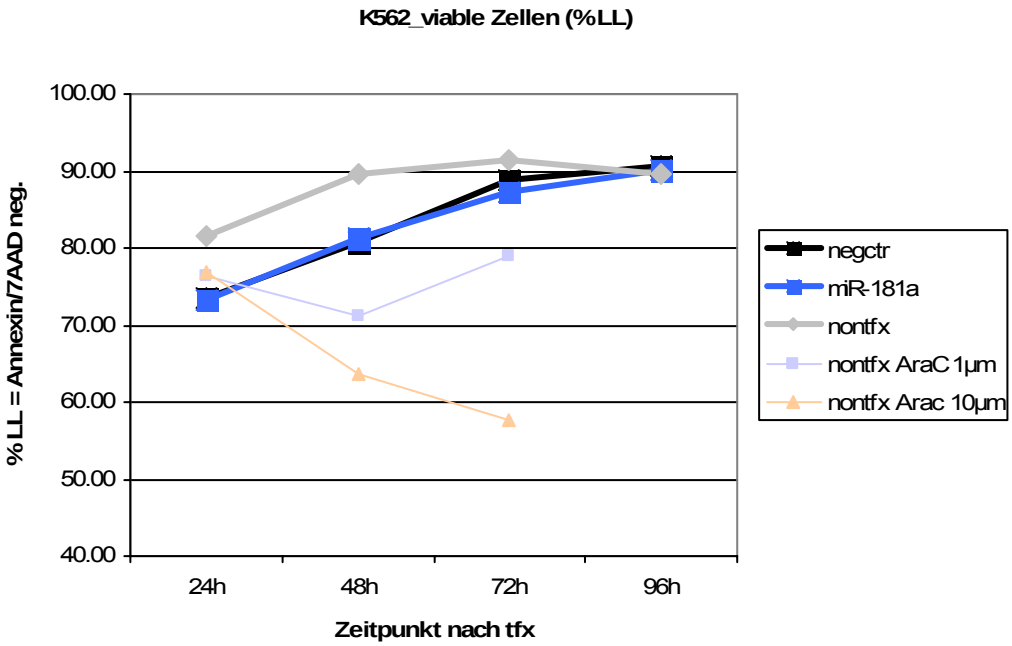


Abbildung 21: **Anteil viabler K562-Zellen zu 4 Zeitpunkten nach Transfektion**

Der Vergleich der mit pre-miR-181a transfizierten Zellen mit der Negativkontrolle ergibt keinen eindeutigen Effekt.
Eine Behandlung mit AraC ergibt erst bei höheren Dosierungen eine eindeutig verminderte Anzahl viabler Zellen.

Abkürzungen:

Annexin / 7AAD neg. = % LL = keine Anfärbung durch Annexin / 7AAD; K562 = Zellinie einer humanen chronisch myeloischen Leukämie in der Blastenkrise; tfx = transfiziert; pre-miR-181a = „miR-181a-mimics“; negctr = Negativkontrolle; nontfx = nicht transfizierte Zellen; AraC = Cytosin-Arabinosid; miR-181a = microRNA 181a

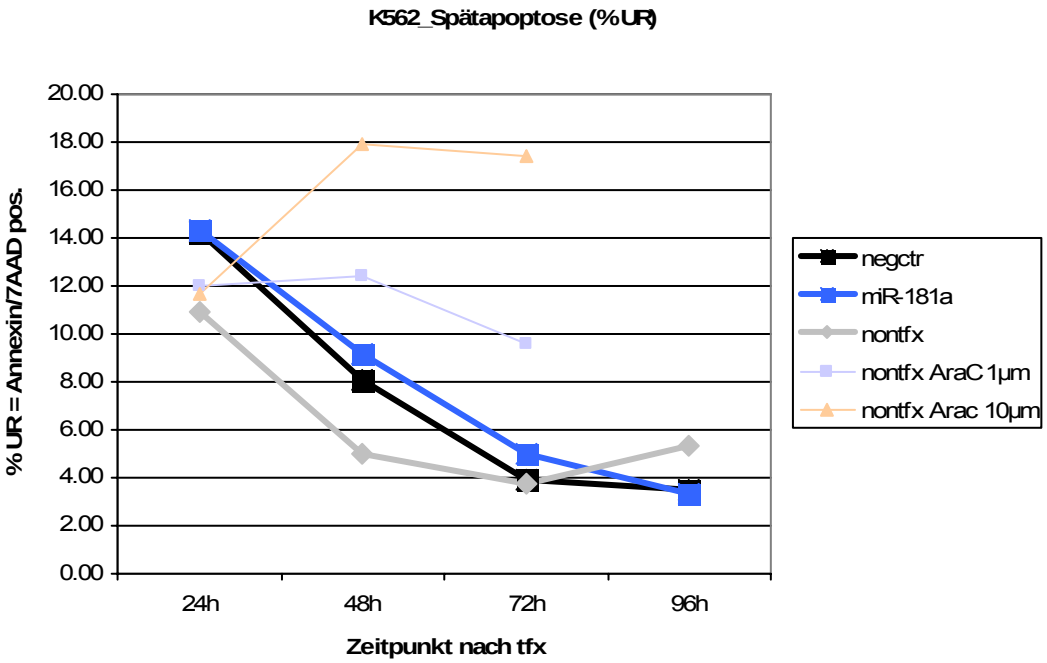


Abbildung 22: **Anteil spätapoptotischer K562-Zellen zu 4 Zeitpunkten nach Transfektion**

Die pre-miR-181a transfizierten Zellen zeigen im Vergleich zur Negativkontrolle etwas vermehrt Apoptose, dieser Effekt erscheint jedoch nicht eindeutig. Eine Behandlung mit AraC ergibt erst in höheren Dosierungen eine eindeutig gesteigerte Apoptoserate.

Abkürzungen:

Annexin / 7AAD pos. = % UR = Anfärbung durch Annexin und durch 7AAD; K562 = Zellinie einer humanen chronisch myeloischen Leukämie in der Blastenkrise; tfx = transfiziert; pre-miR-181a = „miR-181a-mimics“; negctr = Negativkontrolle; nontfx = nicht transfizierte Zellen; AraC = Cytosin-Arabinosid; miR-181a = microRNA 181a

3.7 Korrelation der miR-181a Expression mit vorhandenen Genexpressionsdaten zur Identifizierung hypothetischer Zielgene

Zur Identifizierung potentieller Zielgene der miR-181a wurden die miR-181a Expressionsdaten mit vorhandenen DNA Microarray-basierten Genexpressionsdaten verglichen. Zunächst wurden die Patientenfälle gemäß ihrer miR-181a Expression in 2 Subgruppen unterteilt, solche mit im Vergleich zur medianen miR-181a Expression hoher und solche mit niedriger miR-181a Expression.

Unter der Hypothese, dass miR-181a regulierte Gene nicht nur über eine verminderte Translation, sondern auch über eine verminderte mRNA Stabilität reguliert werden, führten wir eine SAM-Analyse durch, um Gene zu identifizieren, deren Expression invers mit der miR-181a Expression korreliert ist, d.h. bei hoher miR-181a Expression ist die Genexpression erniedrigt und bei niedriger miR-181a Expression ist die

Zielgenexpression erhöht. Mit Hilfe von SAM wurden 89 Gene gefunden, die eine entsprechende signifikante Korrelation aufwiesen. Diese Gene wurden mittels einer Datenbankrecherche mit vorhergesagten miR-181a Zielgene (basierend auf vorhergesagten microRNA-Bindungsstellen) abgeglichen (http://genome.ewha.ac.kr/miRGator/miRGator.html und www.mirbase.org). Die Liste der 89 Gene konnte somit auf 8 potentielle miR-181a Zielgene reduziert werden.

Tabelle 9: Liste mit potentiellen miR-181a Zielgenen

Abkürzungen:

AKT3 = „v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3“; *BCL6* = „B-cell CLL/lymphoma 6“; *BMPR2* = „bone morphogenetic proteinreceptor type II“; *CDC42BPA* = „CDC42 binding proteinkinase alpha“; *DUSP5* = „dual specificity phophatase 5“; *IRS2* = „insulin receptor substrate 2“; *PLA2G4A* = „phospholipase A2“; *SCHIP1* = „schwannomin interacting protein 1“; ; miR-181a = microRNA 181a; GEP = Gene expression profiling

Potentielle Zielgene	Anzahl der miR-181a Bindungsstellen	Korrelation mit GEP-Daten
AKT3	2	-0.3635118
BCL6	2	-0.3444058
BMPR2	1	-0.3746639
CDC42BPA	1	-0.4463586
DUSP5	2	-0.3538026
IRS2	3	-0.3902473
PLA2G4A	1	-0.3727695
SCHIP1	2	-0.3672513

3.8 qRT-PCR Analyse der Auswirkung einer miR-181a Überexpression auf die potentiellen Zielgene

Mittels SYBR Green®-qRT-PCR wurde die Genexpression der potentiellen Zielgene in pre-miR-181a transfizierten Zellen und in leer transfizierten Zellen (Negativkontrolle) nach 24 h und 48 h ermittelt. Dabei zeigten 3 der 8 potentiellen Zielgene Genexpressionsveränderungen, die der Hypothese entsprechen, d.h. dass eine Überexpression der miR-181a über eine Bindung an die entsprechende mRNA zu einer erniedrigten Expression des entsprechenden Gens führt. Nachfolgend sind die Ergebnisse für diese drei Gene *CDC42BPA*, *DUSP5* und *IRS2* graphisch dargestellt (siehe Abbildung 23, 24 und 25; die Ergebnisse für die Kandidaten ohne Veränderungen sind nicht dargestellt).

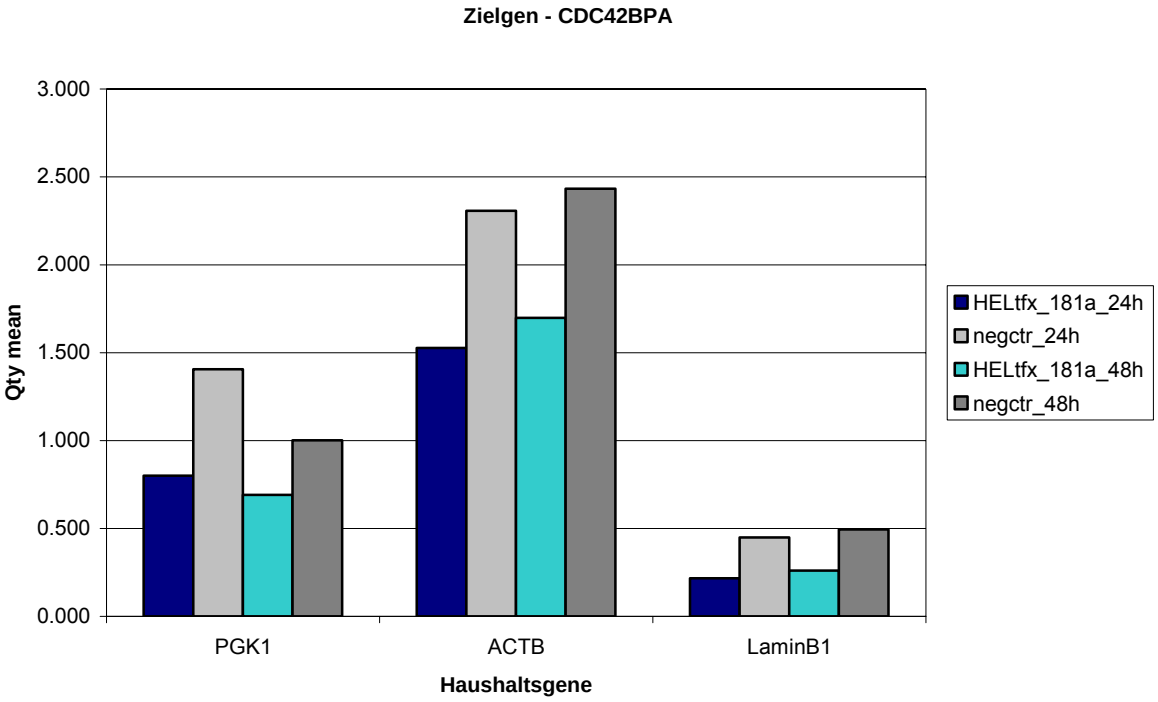


Abbildung 23: ***CDC42BPA*-Expression in pre-miR-181a transfizierten HEL-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle**

Die Messungen wurden an 2 Zeitpunkte durchgeführt (24 h und 48h nach Transfektion) und die Werte mit 3 verschiedenen Haushaltsgenen normalisiert. Durch eine Überexpression der miR-181a zeigte sich eine deutlich erniedrigte *CDC42BPA*-Expression im Vergleich zur Negativkontrolle.

Abkürzungen:

CDC42BPA=„CDC42 binding proteinkinase alpha“; HEL = humane Erythroblastenleukämiezelllinie; tfx_181a = mit pre-miR-181a transfiziert; negctr = Negativkontrolle; Qty mean = mittlere Quantität; PGK1 = „phosphoglycerate kinase 1“; ACTB = „Actin, beta“; Lamin B1 = „lamin B1“; miR-181a = microRNA 181a

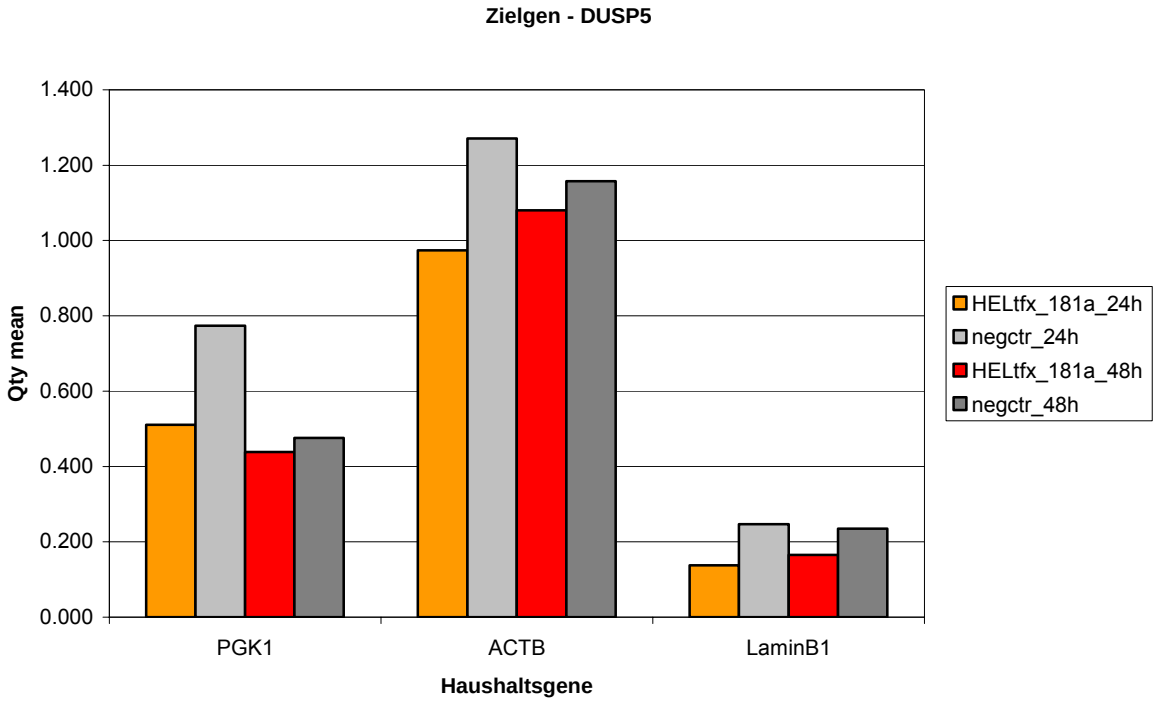


Abbildung 24: ***DUSP5*-Expression in pre-miR-181a transfizierten HEL-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle**

Die Messungen wurden an 2 Zeitpunkten durchgeführt (24 h und 48h nach Transfektion) und die Werte mit 3 verschiedenen Haushaltsgenen normalisiert. Durch eine Überexpression der miR-181a zeigte sich eine deutlich erniedrigte *DUSP5*-Expression im Vergleich zur Negativkontrolle.

Abkürzungen:

DUSP5 = „dual specificity phophatase 5"; HEL = humane Erythroblastenleukämiezelllinie; tfx_181a = mit pre-miR-181a transfiziert; negctr = Negativkontrolle; Qty mean = mittlere Quantität; PGK1 = „phosphoglycerate kinase 1"; ACTB = „actin, beta"; Lamin B1 = „lamin B1"; miR-181a = microRNA 181a

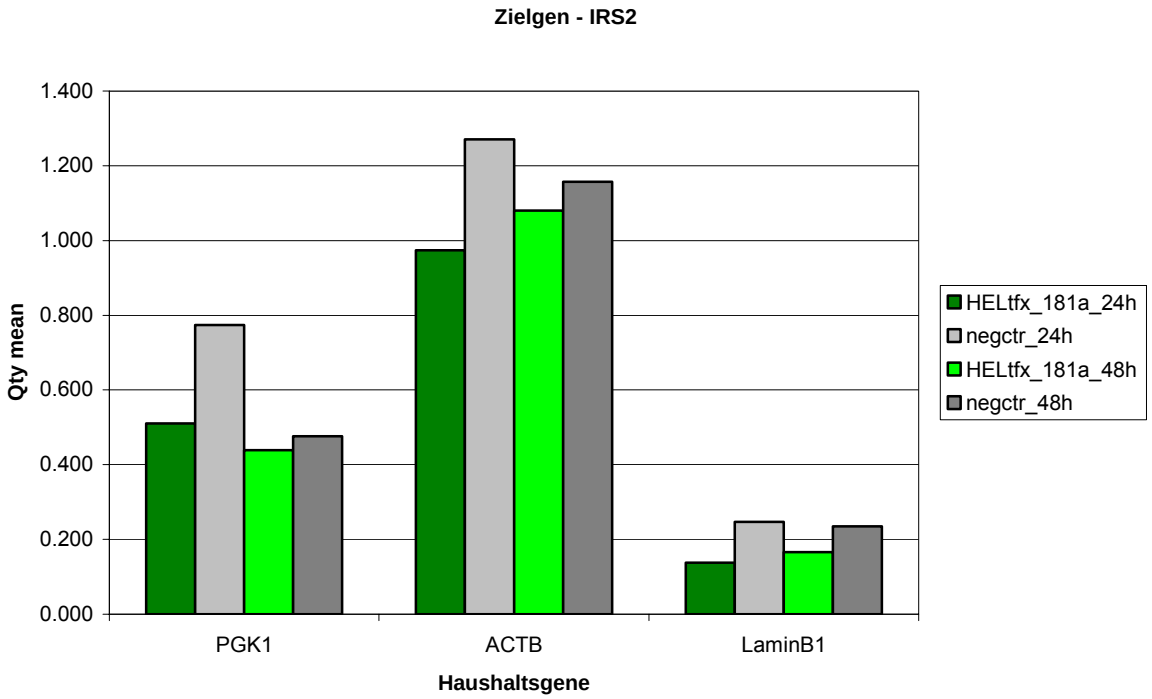


Abbildung 25: ***IRS2*-Expression in pre-miR-181a transfizierten HEL-Zellen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle**

Die Messungen wurden an 2 Zeitpunkten durchgeführt (24 h und 48h nach Transfektion) und die Werte mit 3 verschiedenen Haushaltsgenen normalisiert. Durch eine Überexpression der miR-181a zeigte sich eine deutlich erniedrigte *IRS2*-Expression im Vergleich zur Negativkontrolle.

Abkürzungen:

IRS2 = „insulin receptor substrate 2"; HEL = humane Erythroblastenleukämiezelllinie; tfx_181a = transfiziert mit pre-miR-181a; negctr = Negativkontrolle; Qty mean = mittlere Quantität; PGK1 = „phosphoglycerate kinase 1"; ACTB = „actin, beta"; Lamin B1 = „lamin B1"; miR-181a = microRNA 181a

4. Diskussion

4.1 Diskussion der qRT-PCR Messungen der Patientenproben

4.1.1 Diskussion der Methodik

Bislang wurden Informationen über die Expression von microRNAs in der AML vor allem mittels Microarray Technologie akquiriert. Diese Methode ist eine gute Möglichkeit mit angemessenem Zeitaufwand die Expression einer Vielzahl von microRNAs zu untersuchen (Yin et al. 2008). Jedoch birgt die Methode den Nachteil von Kreuzhybridisierungen und hat demnach vor allem für kleine microRNAs eine eingeschränkte Sensitivität und Spezifität. Ferner ist die Microarray Technologie relativ teuer, insbesondere wenn viele Fälle mit dieser Methode untersucht werden müssen.

Sensitiver ist die qRT-PCR Methode, bei der sich die Normalisierung schwieriger gestaltet. Ein weiterer Nachteil der qRT-PCR gegenüber den Microarrays ist auch die Menge an Information, die gewonnen werden kann. So können mittels Microarrays alle microRNAs gleichzeitig gemessen werden, wohingegen die Anzahl der mit qRT-PCR messbaren microRNAs geringer ist (Git et al. 2010).

Trotz dieser Nachteile können qRT-PCR Messläufe gut standardisiert und unter identischen Bedingungen durchgeführt werden. Dementsprechend eignet sich die qRT-PCR für den Einsatz im klinischen Routinelabor und stellt somit eine ideale Methode in Bezug auf die Fragestellung der Arbeit dar.

4.1.2 Diskussion der Ergebnisse der Messung im HD98A-Patientenkollektiv

Bei der Messung von 83 Fällen aus dem AMLSG HD98A-Patientenkollektiv zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer veränderten miR-181a Expression und einem Vorteil oder Nachteil im Gesamtüberleben dieser Patientenkohorte. Es zeichnete sich aber ein starker Trend dieser Patienten dahingehend ab, dass eine erhöhte miR-181a Expression einen Vorteil in Bezug auf das ereignisfreie Überleben aufweist. Im Gegensatz zu der Studie von Marcucci et al. konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied aufgezeigt werden (Marcucci et al. 2008b). Dies kann in der Anzahl der untersuchten Patientenfälle begründet sein. Zwar unterscheidet sich die Größe der in dieser Arbeit untersuchten Kohorte nicht

wesentlich von den 55 von Marcucci et al. gemessenen Fälle (Marcucci et al. 2008b), dennoch könnte eine Anzahl von 83 Fällen in unserer Studie bei einem geringen Einfluss von miR-181a nicht ausreichend sein, um eine statistische Signifikanz zu erreichen. Außerdem wurden in der Arbeit von Marcucci et al. die miR-181a Expression mittels Microarray Untersuchungen erhoben, wohingegen in der vorliegenden Arbeit die sensitivere qRT-PCR Methodik angewandt wurde.

Es zeichnete sich in der durchgeführten Analyse ein starker Trend ab, der die Ergebnisse der Marcucci et al. Studie dahingehend bestätigt, dass eine erhöhte miR-181a Expression einen Vorteil in Bezug auf ein ereignisfreies Überleben zu haben scheint. Auch Schwind et al. konnten in einer Kohorte von 187 Patienten mit CN-AML einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer erhöhten miR-181a Expression mit einem verbesserten ereignisfreien Überleben und Gesamtüberleben zeigen (Schwind et al. 2010). Die Daten zur miR-181a Expression wurden jedoch, wie auch schon bei der Studie von Marcucci et al., in dieser Studie mittels Microarray Untersuchung erhoben. Die Ergebnisse der Microarray Untersuchung wurden von Schwind et al. zwar mittels qRT-PCR validiert, es wurden aber lediglich 30 der 187 Fälle mittels qRT-PCR nachgemessen (Schwind et al. 2010). Ein möglicher Zusammenhang ist daher wahrscheinlich, auch wenn in der vorliegenden Arbeit keine statistische Signifikanz gezeigt werden konnte.

Die Unabhängigkeit der miR-181a Expression von bekannten molekularen Markern, welche mit einer guten Prognose assoziiert sind, wie zum Beispiel Mutationen des *CEBPA*-Gens, konnte in unserer Arbeit jedoch im Gegensatz zu Marcucci und Kollegen nicht gezeigt werden. Vielmehr konnte eine hoch-signifikante Assoziation zwischen einer erhöhten miR-181a Expression und einer vorliegenden *CEBPA*-Mutation identifiziert werden. Dies macht einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten miR-181a Expression und einem Vorteil im ereignisfreien Überleben sehr wahrscheinlich, da eine *CEBPA*-Mutation mit einem guten klinischen Ansprechen assoziiert ist und eine erhöhte miR-181a Expression wiederum mit dem Vorliegen einer *CEBPA*-Mutation. Dass aber dennoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der miR-181a Expression und dem Vorteil beim Überleben gezeigt werden konnte, könnte wie bereits erwähnt in der kleinen Fallzahl oder auch in der geringen Anzahl an *CEBPA* mutierten Fällen in unserem Kollektiv begründet sein.

In der initialen Arbeit von Marcucci et al. wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen einer erhöhten miR-181a Expression und einer gleichzeitig vorliegenden *CEBPA*-Mutation nicht untersucht (Marcucci et al. 2008b). Um die Korrelation erhöhter miR-181a Expression mit einer *CEBPA*-Mutation weiter zu validieren, wurde nachfolgenden ein weiteres unabhängiges Studienkollektiv untersucht.

4.1.3 Diskussion der Ergebnisse der Messung im 07-04-Patientenkollektiv

Die Ergebnisse der Messung von 47 Patientenfällen aus dem AMLSG 07-04-Kollektiv konnten die Korrelation erhöhter miR-181a Expressionswerte mit dem gleichzeitigen Vorliegen einer *CEBPA*-Mutation bestätigen. Somit ist eine zufällige Korrelation eher unwahrscheinlich. Die Ergebnisse dieser Messung konnten jedoch nicht zur Validierung des Zusammenhanges einer erhöhten miR-181a Expression mit einem Überlebensvorteil herangezogen werden, da die Nachbeobachtungszeit in dieser Studie dafür noch zu kurz und somit nicht aussagekräftig genug ist.

Obwohl also der Einfluss einer erhöhten miR-181a Expression auf das klinische Outcome von Patienten mit einer zytogenetisch normalen AML, nicht zuletzt durch den Zusammenhang mit dem Vorliegen einer *CEBPA*-Mutation, sehr wahrscheinlich ist, konnte letztlich keine statistische Signifikanz dieses Effektes gezeigt werden. Eine Analyse in einem größeren Patientenkollektiv könnte den Einfluss der miR-181a Expression letztendlich klären.

Auch in einer aktuellen Arbeit aus der Arbeitsgruppe von Marcucci und Bloomfield wurde ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten miR-181a Expression und dem Vorliegen einer *CEBPA*-Mutation gezeigt (Schwind et al. 2010). In dieser Arbeit zeigte eine erhöhte miR-181a Expression jedoch in der Subgruppe von Patienten mit einer *FLT3*-ITD-Mutation und einem *NPM1*-Wildtyp den größten Überlebensvorteil, was wiederum für einen zusätzlichen, von einer *CEBPA*-Mutation unabhängigen, Effekt der miR-181a Expression spricht. Zudem war der Überlebensvorteil der Subgruppe mit erhöhter miR-181a Expression auch noch zu sehen, nachdem es für das Vorliegen einer *CEBPA*-Mutation statistisch adjustiert wurde.

Die prognostische Relevanz einer veränderten miR-181a Expression bleibt jedoch durch den sehr wahrscheinlichen Zusammenhang mit dem Vorliegen einer *CEBPA*-Mutation fraglich, da eine *CEBPA*-Mutation bereits einen guten prognostischen Marker darstellt.

4.2 Diskussion der Zelllinenexperimente

Die Beobachtung einer signifikanten Korrelation der miR-181a Expression mit dem Vorliegen von *CEBPA*-Mutationen lässt die Frage aufkommen, ob die miR-181a Expression hier nur einen „unbeteiligten“ Surrogatmarker darstellt, oder ob die miR-181a Expression in der Pathogenese der CN-AML mit *CEBPA*-Mutationen eine Rolle spielt. Andererseits lassen die Ergebnisse von Schwind et al., die einen von *CEBPA*-Mutationen unabhängigen Effekt zeigen (Schwind et al. 2010), vermuten, dass der miR-181a Effekt nicht zwangsläufig vom Vorliegen einer CEBPA-Mutation abhängig ist. Um die miR-181aEffekte weiter abzuklären, wurden die Auswirkung einer miR-181a Überexpression in Leukämiezelllinienmodellen untersucht. Dazu wurde zum einen die Auswirkung einer miR-181a Überexpression auf Zellebene, d.h. auf Apoptose- und Proliferationsverhalten, untersucht, zum anderen wurden auf Genebene vermeintliche Zielgene der miR-181a gesucht und überprüft.

4.2.1 Diskussion der Methodik

In dieser Arbeit wurden zur Darstellung der Auswirkung einer miR-181a Überexpression Leukämiezelllinien, HEL und K562, als Modell gewählt. Die Zelllinien stellen dadurch, dass sie immortalisiert sind, keine optimalen physiologischen Modellsysteme dar. Eine Untersuchung der Veränderungen *in-vivo* mittels eines Maus-Modells wäre hier sicher besser geeignet gewesen. Dennoch stellt die Untersuchung von Zelllinien vor allem für ein erstes orientierendes Screening eine gute Option dar, zumal die Handhabung und Durchführung der Experimente im Vergleich zu Versuchen am Maus-Modell im Rahmen dieser Arbeit zuverlässiger und einfacher durchführbar waren. Zudem konnte gezeigt werden, dass Leukämiezelllinien hinsichtlich ihrer Genexpression gut mit den Primärtumoren übereinstimmen und somit trotz einiger Nachteile die AML gut reflektieren und dementsprechend zuverlässige Modellsysteme hinsichtlich der Fragestellung dieser Arbeit darstellen (Rücker et al. 2006). Die gewählten Zelllinien, HEL und K562 zeichnen sich durch eine gute Handhabung bei der Durchführung der Transfektion aus. Außerdem weisen beide Zelllinien keine *CEBPA*-Mutation auf, so dass die Auswirkungen einer miR-181a Überexpression unabhängig von dem Vorliegen einer solchen Mutation untersucht werden können.

Um eine miR-181a Überexpression in den Zellen zu simulieren, wurde eine transiente Transfektion von pre-miRs, sog. miR-mimics, durchgeführt. Diese Methode

zeichnet sich durch eine einfache Durchführbarkeit aus. Die Überexpression ist jedoch nicht, wie unter physiologischen Bedingungen, kontinuierlich, vielmehr wird einmalig eine große Menge pre-miRs in die Zelle eingebracht, so dass der Effekt der Überexpression nur vorübergehend ist. Dadurch könnten eventuell auftretende Veränderungen, welche eine längere Exposition der Überexpression benötigen, nicht erkennbar sein. Zudem ist die Stärke der Überexpression nur bedingt durch die Menge der transfizierten miR-mimics beeinflussbar. Bei der Transfektion wird meist eine sehr große Menge an pre-miRs eingebracht, welche über dem physiologischen Level liegen kann. So können bei diesem Versuch zwar Effekte einer sehr starken Überexpression beobachtet werden, physiologische Levels könnten jedoch andere Auswirkungen haben. Ferner wird bei der angewandten Methode die Transfektion mittels Elektroporation durchgeführt. Dies stellt für die Zellen einen großen Stress dar, so dass zum einen viele Zellen allein aufgrund der Transfektion sterben, zum anderen die bemerkten Veränderungen nicht nur auf die Überexpression der miR-181a zurück zu führen sind.

Eine Alternative mit höherer Transfektionseffizienz und weniger Stress für die Zellen wäre eine retrovirale Transfektion, bei der auch eine kontinuierliche Überexpression der miR-181a erzielt werden könnte. Dabei werden aber die entsprechenden Gene häufig in sog. „common retroviral integration sites“ eingebaut, in denen viele Tumor-assoziierte Genregionen zu finden sind, so dass die Effekte auch hier durch andere Faktoren beeinflusst werden können. Außerdem ist hierfür ein äußerst aufwendiges retro/lentivirales Arbeiten notwendig.

4.3 Diskussion des beobachteten Phänotyps

Die Auswirkung einer miR-181a Überexpression wurde auf Zellebene mittels Zellzählung und Apoptose-Assay untersucht, wobei das Proliferations- und Apoptoseverhalten der transfizierten Zellen mit dem der Negativkontrollen verglichen wurde. Desweiteren wurde auf Ebene der Genexpression, mittels qRT-PCR, Gene untersucht, die potentielle Zielgene der miR-181a darstellen.

4.3.1 Diskussion der Ergebnisse der Zellzählung

Das mittels Zellzählung dargestellte Proliferationsverhalten zeigte in Zellen mit einer miR-181a Überexpression nur sehr diskrete Unterschiede im Vergleich zum Proliferationsverhalten von leer transfizierten Negativkontrollen. Die diskreten

Unterschiede können am ehesten im Rahmen von Messschwankungen gesehen werden und haben daher keine eindeutige Signifikanz. Um signifikante Abweichungen eindeutig zeigen zu können, bedarf es weiterer Messungen mit einem optimierten Versuchansatz. So könnte eine andere Transfektionsmethode, z.B. lentivirale Transfektion, durch eine höhere Transfektionseffizienz und ein vermindertes Zellsterben zu eindeutigeren Ergebnisse führen.Zudem könnten die Zeitpunkte der Messungen nach Transfektion zu früh gewählt worden sein, so dass sich eventuell auftretende Veränderungen erst wesentlich später deutlich manifestieren und damit in diesem Versuch nicht eindeutig erkannt werden konnten. Während sich bei den mit pre-miR-181a transfizierten HEL-Zellen im Vergleich zu den leer transfizierten Zellen zumindest 48 Stunden nach Transfektion eine diskret höhere Zellzahl zeigte, konnte bei K562 keinerlei Unterschied festgestellt werden. Dieser Unterschied zwischen den beiden verwendeten Zelllinien könnte vom genetischen Hintergrund abhängen, in dem sich die beiden Zelllinien unterscheiden. So weist K562 im Gegensatz zu HEL eine BCR/ABL1, t(9;22) Translokation auf. Diese Translokation ist nur sehr selten bei AML-Fällen zu finden, häufiger in Fällen mit CML oder ALL, so dass einer miR-181a Überexpression bei diesem genetischen Hintergrund eventuell keine Relevanz zukommt.

Auch könnte eine miR-181a Überexpression im Falle einer vorhandenen miR-181a Expression auf physiologischem Level keine oder nur sehr geringe Effekte bewirken, so dass weiterführend die Auswirkung einer verminderten miR-181a Expression untersucht werden sollte. Dazu könnte zum Beispiel ein miR-181a knockdown mittels „antagomiRs“ in Zelllinien mit hoher miR-181a Expression durchgeführt werden. Dadurch könnte eventuell gezeigt werden, dass der prognostische Vorteil der erhöhten miR-181a Expression in *CEBPA*-mutierten AML-Fällen nicht durch den erhöhten Level der miR-181a Expression dieser Fälle, sondern vielmehr durch die verminderte Expression der miR-181a in den anderen Fällen verursacht wird. Somit würde der Effekt einer verminderten miR-181a Expression auf zellulärer Ebene einen prognostischen Nachteil darstellen.

Debernardi et al. konnten zeigen, dass die miR-181a über eine Vielzahl von Zielgenen mit morphologischen FAB-Subtypen der AML korreliert. So zeigten vorwiegend M1- und M2-Phänotypen einen Zusammenhang mit miR-181a korrelierenden Zielgenen und einer erhöhten miR-181a Expression. Interessanterweise wird die miR-181a unter physiologischen Umständen vor allem in

B- und T-Lymphozyten sowie Monozyten und Granulozyten exprimiert, was nicht mit den morphologischen Subtypen M1 und M2 vereinbar ist. Somit kann vermutet werden, dass aufgrund einer veränderten miR-181a Expression die Zelldifferenzierung und –entwicklung verändert wird (Debernardi et al. 2007). In Übereinstimmung wurde in der Arbeit von Cuesta et al. gezeigt, dass miR-181a regulierend auf p27, einen Tumorsuppressor mit hemmender Wirkung auf den Zellzyklus, eingreift. Dabei wird die Translation von p27 durch miR-181a in undifferenzierten HL60-Zellen gehemmt, wodurch es aufgrund des akkumulierten p27 in den Zellen zur endgültigen Differenzierung, zu „monocyte-like cells“, kommt. Hier reguliert die miR-181a Expression also nicht nur das Zellwachstum, sondern nimmt vielmehr Einfluß auf die Zelldifferenzierung (Cuesta et al. 2009).

Eine veränderte miR-181a Expression kann aber auch über einen Zusammenhang mit dem NFκB-Signalweg Einfluss auf die Zellproliferation nehmen. Über Zielgene, wie z.B. *TLR2* und *NLR,* kann eine aberrante miR-181a Expression eine Aktivierung des NFκB-Signalweges und eine Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren, wie z.B. Interleukin-1β, bewirken. Hierdurch kommt es zu veränderten Genexpressionsmustern, die z.B. in AML-Blasten zu einem aggressiveren, schneller proliferierenden Leukämietyp führen könnten (Marcucci et al. 2008b).

In anderen Tumoren, wie z.B. Gliomzellen, wirkt miR-181a als Tumorsuppressor, indem das Zellwachstum gehemmt und Apoptose induziert wird (Shi et al. 2008). Hier zeigt sich ein Effekt auf Zellwachstum und Apoptoseverhalten. In monoklonalen Gammopathien und beim multiplen Myelom (MM) zeigt sich ebenfalls eine erhöhte miR-181a Expression. Pichiorri et al. konnten durch Behandlung von MM-Zelllinien mit miR-181a-Antagonisten ein deutlich reduziertes Tumorwachstum zeigen (Pichiorri et al. 2008). Hier zeigt sich also ebenfalls ein Zusammenhang von miR-181a Expressionslevel und dem Wachstumsverhalten von Zellen.

Eine Ursache für die miR-181a Deregulation in einem Teil der AML-Fälle könnte in Zusammenhang mit der von Wang et al. aufgewiesen Regulation von miR-181a durch TGF-ß liegen. TGF-ß ist in embryonalen oder somatischen Stammzellen und auch in Tumorstammzellen exprimiert. Die für Tumorentstehung, -wachstum und Metastasierung verantwortlichen Tumorstammzellen stellen den Stammzell-eigenschaften besitzenden Teil der Tumorzellen dar. TGF-ß bewirkt hier eine vermehrte miR-181a Expression und somit eine verminderte Expression der miR-181a Zielgene, wie z.B. dem Tumorsuppressorgen *ATM* (Wang et al. 2010).

Während eine vermehrte miR-181a über Suppression von Tumorsuppressoren wie *ATM* zu der Entstehung von Tumorstammzellen beitragen kann, könnte wiederum in der AML eine erhöhte Expression von miR-181a einen erhöhten Tumorstammzellanteil in der Leukämie reflektieren, was wiederum ein Surrogat für schlechteres klinisches Ansprechen darstellt.
So kann eine veränderte miR-181a Expression nicht allein auf das Zellwachstum und Apoptoseverhalten Einfluss nehmen, sondern vielmehr auch auf die Differenzierung der Zellen. Zudem kann auch ein Zusammenhang mit der Entstehung von Tumorstammzellen bestehen.
Ein normales Wachstums- und Apoptoseverhalten der Zellen bei Überexpression der miR-181a schließt demnach den Einfluss der miR-181a in der multifaktoriellen Entstehung einer AML nicht aus.

4.3.2 Diskussion der Ergebnisse des Apoptose-Assays

Auch im Apoptoseverhalten der miR-181a überexprimierten Zellen konnten im Vergleich zu den leer transfizierten Zellen keine eindeutigen Ergebnisse gezeigt werden. Für transfizierte HEL-Zellen zeigten sich diskrete Unterschiede im Sinne einer verminderten Apoptose. Dieser Effekt zeigte sich bereits in einer diskret erhöhten Zellzahl bei der Zellzählung. Lwin et al. konnten in follikulären dendritischen Zellen zeigen, dass eine Überexpression von miR-181a über eine verminderte Expression des Apoptose-fördernden Proteins Bim zu einer verminderten Apoptoserate führen kann (Lwin et al. 2010).
Als Erklärung für die diskreten Unterschiede bei HEL und dem Fehlen eines Effektes bei K562 können die oben genannten Gründe herangezogen werden. So könnte es sich um Schwankungen bei den Messungen handeln oder die Zeitpunkte der Messung könnten zu früh gewählt sein, so dass der wirkliche Effekt der miR-181a Überexpression noch nicht beobachtet werden konnte. Als Erklärung für die Unterschiede zwischen den Zelllinien kommen auch die unterschiedlichen genetischen Veränderungen beider Zelllinien in Frage. So weist K562 im Gegensatz zu HEL eine t(9;22) mit resulierendem *BCR/ABL1* Fusionsgen auf. Diese Veränderung ist keineswegs typisch für eine AML, sondern findet sich vielmehr bei der CML und ALL.
Da jedoch die Ergebnisse bei den transfizierten HEL-Zellen in dieselbe Richtung weisen, wird ein tatsächlicher Effekt umso wahrscheinlicher. Zur letztlichen Klärung

eines Effekts einer miR-181a Überexpression auf Proliferations- und Apoptoseverhalten von Zellen müssen weitere Versuche mit einem optimierten Zellsystem durchgeführt werden. Besser wäre die Untersuchung des Effektes an primären AML-Blasten in Kultur.

4.3.3 Diskussion der qRT-PCR Ergebnisse zu den potentiellen Kandidatengenen

Auf Ebene der mRNA zeigte die miR-181a Überexpression einen Effekt auf drei potentielle Zielgene, *CDC42BPA, DUSP2* und *IRS1*. Die vorhergesagten Zielgene zeigten nach miR-181a Überexpression eine verminderte mRNA Expression. Die Funktionsweise der microRNAs besteht nicht nur in der Hemmung der mRNA-Translation, sondern auch in der Modulation der mRNA-Expression. Guo et al. konnten zeigen, dass die Hauptwirkungsweise der microRNA nicht in der Hemmung der Translation besteht, sondern vielmehr in der Destabilisierung der translatierten mRNA (Guo et al. 2010). Dementsprechend können die beobachteten mRNA Veränderungen von einer direkten Regulation durch miR-181a verursacht sein. Um jedoch genauere Einblicke in die Funktionsweise der miR-181a gewinnen zu können, sind noch weiterführende Versuche notwendig, da es sich auch um sekundäre Effekte handeln könnte. Dementsprechend müssen die Effekte der miR-181a Expression auf ihre direkten Zielgene mittels Reporter-Assay noch bestätigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit soll als erster Schritt der mögliche Einfluss der mit der miR-181a assoziierten Deregulation der entsprechenden Kandidatengene diskutiert werden, unabhängig von einer direkten oder indirekten Regulation.

CDC42BPA

CDC42BPA, „CDC42-binding proteinkinase alpha“, kodiert ein Protein, das zur Familie der Serin/Threonin Proteinkinasen gehört. CDC42BPA bindet CDC42 und fungiert als nachgeschalteter Effektor dieser Rho GTPase, der eine entscheidende Bedeutung bei der Hämatopoese zukommt (Mulloy et al. 2010). CDC42 spielt eine Rolle bei Zellproliferation und Zellmotilität, zudem wird eine veränderte CDC42 Funktion in Zusammenhang mit Tumorentstehung und Tumorprogression beschrieben (Sinha u. Yang 2008).

Eine verminderte CDC42BPA Expression infolge einer erhöhten miR-181a Expression führt zu einer Verminderung des von CDC42 vermittelten Signalwegs,

was einer verminderten Rho-GTPase CDC42 Aktivität entspricht und so zum malignen Phänotyp beitragen kann. In Mausmodellen konnte z.B. gezeigt werden, dass ein Verlust der Expression von CDC42 in einem fatalen myeloproliferativen Syndrom resultiert, welches sich mit einer Leukozytose im peripheren Blut, myeloischer Hyperproliferation im Knochenmark und Milz sowie myeloischer Organinfiltration präsentiert (Yang et al. 2007). Ferner sind CDC42 knock-out Mäuse durch eine schwere Anämie mit einem frühen Block der Erythropoese und Proliferation sowie einem verlängertem Überleben der myeloischen Zellreihe gekennzeichnet. Im Falle einer Blockade der CDC42 Funktion durch eine von der miR-181a Expression vermittelten CDC42BPA Verminderung kann es gegenregulatorisch auch zu einer Erhöhung der CDC42 Expression kommen. In Analogie wurde in murinen MLL-AF9 AML Modellen CDC42 als verstärkt exprimiert beobachtet (Rozenveld-Geugien et al. 2007).

DUSP5

Auch für *DUSP5,* „dual specificity phosphatase 5“, zeigte sich bei einer miR-181a Überexpression eine verminderte Genexpression. *DUSP5* kodiert ein Protein der „dual specificity protein phosphatase“-Subfamilie, deren Phophatasen ihre Zielkinasen durch Dephosphorylierung inaktivieren. Somit haben sie negative Effekte auf MAP, „mitogen-activated protein“ Kinasen, die mit Zellproliferation und Zelldifferenzierung assoziiert sind. Diese Phosphatasen vermitteln zudem eine vermehrte M-CSF Expression und spielen somit eine Rolle bei der Differenzierung von Makrophagen und Granulozyten (Grasset et al. 2010). Durch eine verminderte Expression von DUSP5 aufgrund einer miR-181a Überexpression kommt es somit zu einer vermehrten MAP Kinasen-Aktivität und zu einer verminderten M-CSF Expression und somit zu einer verminderten Differenzierung von Makrophagen und Granulozyten. Somit könnte die miR-181a Überexpression eine Auswirkung auf das Proliferations- und Apoptoseverhalten der transfizierten Zellen haben und auch über einen Differenzierungsblock zur Pathogenese beitragen.

Keyse et al. beschreibt einen Zusammenhang zwischen einer verminderten Expression oder Funktion von MKPs, den „dual-specificity“ MAP Kinase Phosphatasen zu denen DUSP5 gehört, und der Entstehung und Progression von Tumoren (Keyse 2008). In Zusammenhang mit hämatologischen Erkrankungen wurde beim Sèzary Syndrom, einer sehr aggressiven Form eines kutanen T-Zell-

Lymphomes, bei 45% aller untersuchten Patienten ebenfalls ein Verlust von *DUSP5* beschrieben (Vermeer et al. 2008).

IRS2

Zuletzt zeigte sich auch für *IRS2* eine verminderte Expression bei Überexpression der miR-181a. *IRS2* kodiert ein zytoplasmatisches Signalmolekül, Insulinrezeptor-Substrat 2, welches den Effekt von Insulin und verschiedenen Zytokinen, wie Insulin-Wachstumsfaktor-1 (IGF-1), vermittelt. Dabei wirkt es als Vermittler zwischen Rezeptor-Tyrosinkinasen und nachgeschalteten Effektoren. Wu et al. konnten zeigen, dass *IRS2* in 32D myeloiden Zellen einen Effekt auf Granulozytenproliferation und –differenzierung hat (Wu et al. 2009). So könnte bei einer verminderten Expression von *IRS2* infolge einer miR-181a Überexpression die Differenzierung von Granulozyten gehemmt werden.

Ferner wirkt *IRS2* über IGF-1 und den entsprechenden Rezeptor bei wichtigen Signalwegen in hämatopoetischen Stammzellen mit. Bei der AML findet sich häufig eine Aktivierung des PI3K, „phosphoinositide-3-kinase“, Signalweges sowie in allen Fällen eine Aktivierung des mTORC1, „mammalian target of rapamycin complex 1“ Signalweges. *IRS2* bewirkt über IGF-1/IGF-1R eine vermehrte Aktivierung von PI3K, und bei einer Hemmung von mTORC1 kommt es durch eine vermehrte *IRS2*-Expression via IGF-1/IGF-1R ebenfalls zu einer vermehrten Aktivität von PI3K (Park et al. 2010). Auch Tamburini et al. konnten zeigen, dass durch Hemmung von mTORC1 mit Everolimus, einem Rapamycin-Derivat, eine vermehrte Expression von IGF-1/IGF-1R und konsekutiv eine gesteigerte Aktivierung von PI3K erzielt wird. Dieser Effekt wurde unter anderem durch eine vermehrte Expression von *IRS2* vermittelt (Tamburini et al. 2008). Das bessere Therapieansprechen der Patienten mit hoher miR-181a Expression könnte u.a. auch auf einer Beeinträchtingung der entsprechende Signalwege aufgrund der verminderten *IRS2* Expression beruhen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Assoziation zwischen miR-181a und *CEBPA* besteht, wobei eine unabhängige prognostische Relevanz der miR-181a Expressionslevel über die prognostische Bedeutung von *CEBPA* hinaus für distinkte Leukämie Subgruppen wahrscheinlich erscheint, in dieser Arbeit jedoch nicht verfiziert werden konnte. Demnach wird die Messung der miR-181a Expression noch weiter evaluiert werden müssen, bevor sie Einzug in die klinische Routinediagnostik

nehmen kann, da solche Effekte auch abhängig vom Therapieregime sein können. Unabhängig von der prognostischen Relevanz der miR-181a haben unsere Untersuchungen jedoch viele neue funktionelle Aspekte der miR-181a Expression ergeben, welche im Rahmen weiterführender Studien weiterer Abklärung bedürfen. Daraus lassen sich wichtige Informationen zum tieferen Verständnis der Biologie gewinnen, welche der AML zugrunde liegt. Letztlich können sich in Zukunft durch ein verbessertes Verständnis der Rolle der miR-181a auch neue therapeutische Erkenntnisse gewinnen lassen, was zu verbesserten Therapieansätzen und einem weiter optimierten Patientenmanagment führen kann.

5. Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie (AML) weist sowohl klinisch als auch biologisch eine große Heterogenität auf, vor allem in den immer noch unzureichend charakterisierten AML-Fällen mit normalem Karyotyp, d.h. ohne zytogenetische Veränderungen (CN-AML). Um eine zuverlässige Subklassifizierung und Risikostratifizierung dieser AML-Fälle möglich zu machen, wurde neben molekularen Markern und Genexpressionsmustern zunehmend ein Augenmerk auf neue Marker, wie z.B. microRNAs (miRs) gerichtet, die ebenfalls mit der Prognose der AML assoziiert sein können. In der vorliegenden Arbeit wurde demzufolge die miR-181a hinsichtlich ihrer prognostischen Relevanz bei AML-Fällen mit normalem Karyotyp evaluiert.

Hierfür wurde die miR-181a Expression mittels quantitativer Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) Messung in einem großen Kollektiv von AML-Fällen mit normalem Karyotyp ermittelt. Anschließend wurden die AML-Fälle anhand ihrer miR-181a Expression in zwei Subgruppen mit niedriger und hoher miR-181a Expression in Bezug auf die mediane miR-181a Expression eingeteilt. Diese Subgruppen zeigten im Hinblick auf das Gesamtüberleben und das ereignisfreie Überleben zwar keine statistisch signifikanten Unterschiede, jedoch zeichnete sich ein starker Trend der Subgruppe mit einer erhöhten miR-181a Expression hinsichtlich einem Vorteil bei dem ereignisfreien Überleben ab. Die anschließende Evaluation des Einflusses bekannter prognostisch relevanter Genmutation zeigte jedoch einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer erhöhten miR-181a Expression und dem Vorliegen einer Mutation des *CEBPA* („CCAAT/enhancer binding protein alpha“) Gens. Der prognostische Vorteil einer erhöhten miR-181a Expression scheint demnach nicht unabhängig, sondern vielmehr vom Vorliegen einer *CEBPA*-Mutation abhängig zu sein. Somit liegt die Vermutung nahe, dass eine erhöhte miR-181a Expression lediglich einen Surrogatmarker für eine *CEBPA*-Mutation und somit für einen bekannten prognostisch günstigen Marker darstellt.

Bei der Untersuchung der funktionellen Effekte einer erhöhten mir-181a Expression auf Zellebene zeigte sich ein leichter Effekt auf das Proliferations- und Apoptoseverhalten von HEL (humane Erythroleukämie) -Zellen. Die Untersuchung der Effekte einer erhöhten miR-181a Expression auf Genebene konnte drei potentielle Zielgene, *CDC42BPA ("CDC42 binding protein kinase alpha")*, *DUSP5 („dual specificity phosphatase 5“)* und *IRS2* („Insulin receptor substrate 2“) identifizieren. Diese Gene könnten unabhängig vom prognostischen Einfluss eine

Rolle in der Pathogenese der miR-181a assoziierten AML spielen, da diese an der Regulation wichtiger zelluläre Prozesse beteiligt sind, und für alle Gene ein Zusammenhang mit der Entstehung von Neoplasien beschrieben ist.

Unsere Untersuchungen liefern einen weiteren Einblick in die Zusammenhänge und Effekte der miR-181a Expression, insbesondere im Hinblick auf neue potentielle Zielgene, die zur Entstehung einer AML beitragen können. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen Potential für eine verbesserte Risikostratifizierung und somit für ein optimiertes Therapiemanagement. Eine weitergehende Evaluation im Rahmen größerer multizentrischer Studien wird letztlich dazu beitragen dieses Potential auch nutzen zu können.

6. Literaturverzeichnis

1. Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, Whitman SP, Archer KJ, Marcucci G, Caligiuri MA, Carroll AJ, Vardiman JW, Powell BL, Allen SL, Moore JO, Larson RA, Kolitz JE, de la Chapelle A, Bloomfield CD: BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study.
   Blood 102: 1613-1618 (**2003**)

2. Baldus CD, Liyanarachchi S, Mrózek K, Auer H, Tanner SM, Guimond M, Ruppert AS, Mohamed N, Davuluri RV, Caligiuri MA, Bloomfield CD, de la Chapelle A: Acute myeloid leukemia with complex karyotypes and abnormal chromosome 21: Amplification discloses overexpression of APP, ETS2, and ERG genes.
   Proc Natl Acad Sci U S A 101: 3915-3920 (**2004**)

3. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, van Putten WL, Valk PJ, van der Poel-van de Luytgaarde S, Hack R, Slater R, Smit EM, Beverloo HB, Verhoef G, Verdonck LF, Ossenkoppele GJ, Sonneveld P, de Greef GE, Löwenberg B, Delwel R:
   High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients.
   Blood 101: 837-845 (**2003**)

4. Bartel DP: MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function
   Cell 116: 281-297 (**2004**)

5. Bartel DP: MicroRNAs: target recognition and regulatory functions
   Cell 136: 215-233 (**2009**)

6. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C: Proposals fort he classification of the acute leukemias. French-American-British (FAB) co-operative group
   Br J Haematol 33: 451-458 (**1976**)

7. Bullinger L, Döhner K, Bair E, Fröhling S, Schlenk RF, Tibshirani R, Döhner H, Pollack JR: Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia
   N Engl J Med 350: 1605-1616 (**2004**)

8. Bullinger L: Gene expression profiling in acute myeloid leukemia.
   Haematologica 91: 733-738 (**2006**)

9. Bullinger L, Rücker FG, Kurz S, Du J, Scholl C, Sander S, Corbacioglu A, Lottaz C, Krauter J, Fröhling S, Ganser A, Schlenk RF, Döhner K, Pollack JR, Döhner H: Gene-expression profiling identifies distinct subclasses of core binding factor acute myeloid leukemiaGene-expression profiling identifies distinct subclasses of core binding factor acute myeloid leukemia
   Blood 110: 1291-1300 (**2007**)

10. Bullinger L, Döhner K, Kranz R, Stirner C, Fröhling S, Scholl C, Kim YH, Schlenk RF, Tibshirani R, Döhner H, Pollack JR: An FLT3 gene-expression signature predicts clinical outcome in normal karyotype AML
Blood 111: 4490-4495 (**2008**)

11. Bullinger L, Döhner K.: The Molecular Basis of Adult AML.
Hematology Education 4: 19-30 (**2010**)

12. Bullinger L, Krönke J, Schön C, Radtke I, Urlbauer K, Botzenhardt U, Gaidzik V, Carió A, Senger C, Schlenk RF, Downing JR, Holzmann K, Döhner K, Döhner H: Identification of acquired copy number alterations and uniparental disomies in cytogenetically normal acute myeloid leukemia using high-resolution single-nucleotide polymorphism analysis
Leukemia 24: 438-449 (**2010**)

13. Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati MJ, Patil SR, Rao KW, Watson MS, Koduru PR, Moore JO, Stone RM, Mayer RJ, Feldman EJ, Davey FR, Schiffer CA, Larson RA, Bloomfield CD, Cancer and Leukemia group B (CALGB 8461): Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction sucess, cumulative incidence of relaps, and overall survival in adult patients with de novo AML
Blood 100: 4325-4336 (**2002**)

14. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM: Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR 15 and miR 16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia
Proc Natl Acad Sci USA 99: 15524-15529 (**2002**)

15. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM: Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers
Proc Natl Acad Sci USA 101: 2999-3004 (**2004**)

16. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM: A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia
N Engl J Med 353: 1793-1801 (**2005**)

17. Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, Taccioli C, Zanesi N, Garzon R, Aqeilan RI, Alder H, Volinia S, Rassenti L, Liu X, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM: MiR-15a and miR-16-1 cluster function in human leukemia
Proc Natl Acad Sci USA 105: 5166-5171 (**2008**)

18. Chen J, Odenike O, Rowley JD: Leukaemogenesis: more than mutant genes
Nat Rev Cancer 10: 23-36 (**2010**)

19. Chomczynski P: A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples
Biotechniques 15: 532-534, 536-537 (**1993**)

20. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM: miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2
Proc Natl Acad Sci U S A 102: 13944-13949 (**2005**)

21. Cowland JB, Hother C, Grønbaek K: MicroRNAs and cancer
APMIS 115: 1090-1106 (**2007**)

22. Cuesta R, Martínez-Sánchez A, Gebauer F: miR-181a regulates cap-dependent translation of p27(kip1) mRNA in myeloid cells
Mol Cell Biol 29: 2841-2851 (**2009**)

23. Debernardi S, Skoulakis S, Molloy G, Chaplin T, Dixon-McIver A, Young BD: MicroRNA miR-181a correlates with morphological sub-class of acute myeloid leukaemia and the expression of its target genes in global genome-wide analysis
Leukemia 21: 912-916 (**2007**)

24. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting, RF, Hannon GJ: Processing of primary MicroRNAs by the Microprocessor complex
Nature 432: 231-235 (**2004**)

25. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P: Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia
N Engl J Med 343: 1910-1916 (**2000**)

26. Döhner K, Döhner H : Molecular characterization of acute myeloid leukemia
Haematologica 93: 976-982 (**2008)**

27. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD; European LeukemiaNet: Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet
Blood 115: 453-474 (**2010**)

28. Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, Lund E, Dahlberg JE: Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas
Proc Natl Acad Sci U S A 102: 3627-3632 (**2005**)

29. Esquela-Kerscher A, Slack FJ: Oncomirs – microRNAs with a role in cancer
Nat Rev Cancer 6: 259-269 (**2006)**

30. Fazi F, Racanicchi S, Zardo G, Starnes LM, Mancini M, Travaglini L, Diverio D, Ammatuna E, Cimino G, Lo-Coco F, Grignani F, Nervi C: Epigenetic

silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein
Cancer Cell 12: 457-466 (**2007**)

31. Fröhling S, Schlenk RF, Breitruck J, Brenner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K, AML Study group Ulm: Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics
Blood 100: 4372-4380 (**2002**)

32. Fröhling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL: Genetics of myeloid malignancies: Pathogenetic and clinical implications
J Clin Oncol 23: 6285-6295 (**2005)**

33. Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, Fabbri M, Coombes K, Alder H, Nakamura T, Flomenberg N, Marcucci G, Calin GA, Kornblau SM, Kantarjian H, Bloomfield CD, Andreeff M, Croce CM: MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia
Blood 111: 3183-3189 (**2008**)

34. Garzon R, Liu S, Fabbri M, Liu Z, Heaphy CE, Callegari E, Schwind S, Pang J, Yu J, Muthusamy N, Havelange V, Volinia S, Blum W, Rush LJ, Perrotti D, Andreeff M, Bloomfield CD, Byrd JC, Chan K, Wu LC, Croce CM, Marcucci G: MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1
Blood 113: 6411-6418 (**2009**)

35. Gilliland DG, Griffin JD: The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia
Blood 100: 1532-1542 (**2002**)

36. Git A, Dvinge H, Salmon-Divon M, Osborne M, Kutter C, Hadfield J, Bertone P, Caldas C: Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression
RNA 16: 991-1006 (**2010**)

37. Grasset MF, Gobert-Gosse S, Mouchiroud G, Bourette RP: Macrophage differentiation of myeloid progenitor cells in response to M-CSF is regulated by the dual-specificity phosphatase DUSP5
J Leukoc Biol 87: 127-135 (**2010**)

38. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP: Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels
Nature 466: 835-840 (**2010**)

39. Haferlach T, Kohlmann A, Schnittger S, Dugas M, Hiddemann W, Kern W, Schoch C: Global approach to the diagnosis of leukemia using gene expression profiling
Blood 106: 1189-1198 (**2005**)

40. Haferlach T: Molecular genetic pathways as therapeutic targets in acute myeloid leukemia.
Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 400-411 (**2008**)

41. Havelange V, Garzon R, Croce CM: MicroRNAs: new players in acute myeloid leukaemia
Br J Cancer 101: 743-748 (**2009**)

42. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM: A microRNA polycistron as a potential human oncogene
Nature 435: 828-833 (**2005**)

43. Heuser M, Beutel G, Krauter J, Döhner K, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Ganser A: High meningioma 1 (MN1) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics
Blood 108: 3898-3905 (**2006**)

44. Heuser M, Argiropoulos B, Kuchenbauer F, Yung E, Piper J, Fung S, Schlenk RF, Dohner K, Hinrichsen T, Rudolph C, Schambach A, Baum C, Schlegelberger B, Dohner H, Ganser A, Humphries RK: MN1 overexpression induces acute myeloid leukemia in mice and predicts ATRA resistance in patients with AML
Blood 110: 1639-1647 (**2007**)

45. Hoffman B, Amanullah A, Shafarenko M, Liebermann DA: The proto-oncogene c-myc in hematopoietic development and leukemogenesis
Oncogene 21: 3414-3421 (**2002**)

46. Huang W, GL Sun, XS Li, Q Cao, Y Lu, GS Jang, FQ Zhang, JR Chai, ZY Wang, S Waxman: Acute promyelocytic leukemia: clinical relevance of two major PML-RAR alpha isoforms and detection of minimal residual disease by retrotranscriptase/polymerase chain reaction to predict relapse.
Blood 82: 1264-1269 (**1993**)

47. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ: RAS is regulated by the let-7 microRNA family
Cell 120: 635-647 (**2005**)

48. Jongen-Lavrencic M, Sun SM, Dijkstra MK, Valk PJ, Löwenberg B: MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia
Blood 111: 5078-5085 (**2008**)

49. Kane EV, Roman E, Cartwright R, Parker J, Morgan G: Tobacco and the risk of acute leukemia in adults
Br J Cancer 81: 1228-1233 (**1999**)

50. Keyse SM: Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer
Cancer Metastasis Rev 27: 253-261 (**2008)**

51. Kuchenbauer F, Morin RD, Argiropoulos B, Petriv OI, Griffith M, Heuser M, Yung E, Piper J, Delaney A, Prabhu AL, Zhao Y, McDonald H, Zeng T, Hirst M, Hansen CL, Marra MA, Humphries RK: In-depth characterization of the microRNA transcriptome in a leukemia progression model
Genome Res 18: 1787-1797 (**2008**)

52. Langer C, Radmacher MD, Ruppert AS, Whitman SP, Paschka P, Mrózek K, Baldus CD, Vukosavljevic T, Liu CG, Ross ME, Powell BL, de la Chapelle A, Kolitz JE, Larson RA, Marcucci G, Bloomfield CD; Cancer and Leukemia Group B (CALGB): High BAALC expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome, and a distinct gene-expression signature in cytogenetically normal patients younger than 60 years with acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B (CALGB) study
Blood 111: 5371-5379 (**2008**)

53. Langer C, Marcucci G, Holland KB, Radmacher MD, Maharry K, Paschka P, Whitman SP, Mrózek K, Baldus CD, Vij R, Powell BL, Carroll AJ, Kolitz JE, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD: Prognostic importance of MN1 transcript levels, and biologic insights from MN1-associated gene and microRNA expression signatures in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study
J Clin Oncol 27: 3198-3204 (**2009)**

54. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN: MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization
EMBO J 21: 4663-4670 (**2002**)

55. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN: MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II
EMBO J 23: 4051-4060 (**2004**)

56. Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN: The role of PACT in the RNA silencing pathway
EMBO J 25: 522-532 (**2006**)

57. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB: Prediction of mammalian microRNA targets
Cell 115: 787-798 (**2003**)

58. Li Z, Lu J, Sun M, Mi S, Zhang H, Luo RT, Chen P, Wang Y, Yan M, Qian Z, Neilly MB, Jin J, Zhang Y, Bohlander SK, Zhang DE, Larson RA, Le Beau MM, Thirman MJ, Golub TR, Rowley JD, Chen J: Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations
Proc Natl Acad Sci U S A 105: 15535-15540 (**2008**)

59. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K: Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization
PCR Methods Appl 4: 357-362 (**1995**)

60. Löwenberg B, Downing JR, Burnett A: Acute myeloid leukemia
N Engl J Med 341: 1051-1062 (**1999**)

61. Löwenberg B, Griffin JD, Tallman MS: Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia
Hematology Am Soc Hematol Educ Program 82-101 (**2003**)

62. Lück SC, Russ AC, Du J, Gaidzik V, Schlenk RF, Pollack JR, Döhner K, Döhner H, Bullinger L: KIT mutations confer a distinct gene expression signature in core binding factor leukaemia
Br J Haematol 148: 925-937 (**2010**)

63. Lugthart S, van Drunen E, van Norden Y, van Hoven A, Erpelinck CA, Valk PJ, Beverloo HB, Löwenberg B, Delwel R: High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated
Blood 111: 4329-4337 (**2008**)

64. Lwin T, Lin J, Choi YS, Zhang X, Moscinski LC, Wright KL, Sotomayor E, Dalton WS, Tao J: Follicular dendritic cell dependent drug resistance of non-Hodgkin lymphoma involves cell-adhesion-mediated Bim down-regulation through induction of microRNA-181a
Blood 116: 5228-5236 (**2010**)

65. Marcucci G, Baldus CD, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrózek K, Whitman SP, Kolitz JE, Edwards CG, Vardiman JW, Powell BL, Baer MR, Moore JO, Perrotti D, Caligiuri MA, Carroll AJ, Larson RA, de la Chapelle A, Bloomfield CD: Overexpression of the ETS-related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study
J Clin Oncol 23: 9234-9242 (**2005**)

66. Marcucci G, Maharry K, Whitman SP, Vukosavljevic T, Paschka P, Langer C, Mrózek K, Baldus CD, Carroll AJ, Powell BL, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD; Cancer and Leukemia Group B Study: High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study
J Clin Oncol 25: 3337-3343 (**2007**)

67. Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Vukosavljevic T, Paschka P, Whitman SP, Langer C, Baldus CD, Liu CG, Ruppert AS, Powell BL, Carroll AJ, Caligiuri MA, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD: 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 26: 5078-5087 (**2008a**)

68. Marcucci G, Radmacher MD, Maharry K, Mrózek K, Ruppert AS, Paschka P, Vukosavljevic T, Whitman SP, Baldus CD, Langer C, Liu CG, Carroll AJ, Powell BL, Garzon R, Croce CM, Kolitz JE, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD: MicroRNA Expression in Cytogenetically normal Acute Myeloid Leukemia
N Engl J Med 358: 1919-1928 (**2008b**)

69. Mayr C, Bartel DP: Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells
Cell 138: 673-684 (**2009**)

70. Metzeler KH, Hummel M, Bloomfield CD, Spiekermann K, Braess J, Sauerland MC, Heinecke A, Radmacher M, Marcucci G, Whitman SP, Maharry K, Paschka P, Larson RA, Berdel WE, Büchner T, Wörmann B, Mansmann U, Hiddemann W, Bohlander SK, Buske C; Cancer and Leukemia Group B; German AML Cooperative Group: An 86-probe-set gene-expression signature predicts survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia
Blood 112: 4193-4201 (**2008**)

71. Metzeler KH, Dufour A, Benthaus T, Hummel M, Sauerland MC, Heinecke A, Berdel WE, Büchner T, Wörmann B, Mansmann U, Braess J, Spiekermann K, Hiddemann W, Buske C, Bohlander SK: ERG expression is an independent prognostic factor and allows refined risk stratification in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a comprehensive analysis of ERG, MN1, and BAALC transcript levels using oligonucleotide microarrays
J Clin Oncol 27: 5031-5038 (**2009**)

72. Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ: Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia
Mol Cancer Res 1: 882-891 (**2003**)

73. Mrozek K, Heinonen K, Bloomfield CD: Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukemia
Best Pract Res Clin Haematol 14: 19-47 (**2001**)

74. Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD: Cytogenetics in acute leukemia
Blood Rev 18: 115-136 (**2004**)

75. Mrozek K, Döhner H, Bloomfield CD: Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances
Curr Opin Hematol 14: 106-114 (**2007**)

76. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction
Cold Spring Harb Symp Quant Biol: 263-273 (**1986**)

77. Mulloy JC, Cancelas JA, Filippi MD, Kalfa TA, Guo F, Zheng Y: Rho GTPases in hematopoiesis and hemopathies
Blood 115: 936-947 (**2010**)

78. O'Donell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT: c_Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression
Nature 435: 839-843 (**2005**)

79. Park S, Chapuis N, Tamburini J, Bardet V, Cornillet-Lefebvre P, Willems L, Green A, Mayeux P, Lacombe C, Bouscary D: Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia
Haematologica 95: 819-828 (**2010**)

80. Pelengaris S, Khan M, Evan GI: Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression
Cell 109: 321-334 (**2002**)

81. Pichiorri F, Suh SS, Ladetto M, Kuehl M, Palumbo T, Drandi D, Taccioli C, Zanesi N, Alder H, Hagan JP, Munker R, Volinia S, Boccadoro M, Garzon R, Palumbo A, Aqeilan RI, Croce CM: MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis
Proc Natl Acad Sci U S A 105: 12885-12890 (**2008**)

82. Pui CH, Robinson LL, Look AT: Acute Lymphoblastic leukemia.
Lancet 371: 1030-1043 (**2008)**

83. Radmacher MD, Marcucci G, Ruppert AS, Mrózek K, Whitman SP, Vardiman JW, Paschka P, Vukosavljevic T, Baldus CD, Kolitz JE, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD; Cancer and Leukemia Group B: Independent confirmation of a prognostic gene-expression signature in adult acute myeloid leukemia with a normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study
Blood 108: 1677-1683 (**2006**)

84. Rawat VP, Thoene S, Naidu VM, Arseni N, Heilmeier B, Metzeler K, Petropoulos K, Deshpande A, Quintanilla-Martinez L, Bohlander SK, Spiekermann K, Hiddemann W, Feuring-Buske M, Buske C: Overexpression of CDX2 perturbs HOX gene expression in murine progenitors depending on its N-terminal domain and is closely correlated with deregulated HOX gene expression in human acute myeloid leukemia
Blood 111: 309-319 (**2008**)

85. Rozenveld-Geugien M, Baas IO, van Gosliga D, Vellenga E, Schuringa JJ: Expansion of normal and leukemic human hematopoietic stem/progenitor cells requires rac-mediated interaction with stromal cells
Exp Hematol 35: 782-792 (**2007**)

86. Rücker FG, Sander S, Döhner K, Döhner H, Pollack JR, Bullinger L: Molecular profiling reveals myeloid leukemia cell lines to be faithful model systems characterized by distinct genomic aberrations
Leukemia 20: 994-1001 (**2006**)

87. Russell NH: Biology of acute leukemia
Lancet 349: 118-122 (**1997**)

88. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Döhner H, German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group: Mutations and treatement outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia
N Engl J Med 358: 1909-1918 (**2008**)

89. Scholl C, Bansal D, Döhner K, Eiwen K, Huntly BJ, Lee BH, Rücker FG, Schlenk RF, Bullinger L, Döhner H, Gilliland DG, Fröhling S: The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed in most cases of acute myeloid leukemia and promotes leukemogenesis
J Clin Invest 117: 1037-1048 (**2007**)

90. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD: Asymmetry in the assembly of the RNAienzyme complex
Cell 115: 199-208 (**2003**)

91. Schwind S, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Holland KB, Margeson D, Whitman SP, Hickey C, Becker H, Metzeler KH, Paschka P, Baldus CD, Liu S, Garzon R, Powell BL, Kolitz JE, Carroll AJ, Caligiuri MA, Larson RA, Marcucci G, Bloomfield CD: Prognostic Significance of Expression of a Single MicroRNA, miR-181a, in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study
J Clin Oncol 28: 5257-5264 (**2010**)

92. Shi L, Cheng Z, Zhang J, Li R, Zhao P, Fu Z, You Y: hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells
Brain Res 1236: 185-193 (**2008**)

93. Sinha S, Yang W: Cellular signaling for activation of Rho GTPase Cdc42
Cell Signal 20: 1927-1934 (**2008**)

94. Suh HC, Ji M, Gooya J, Lee M, Klarmann KD, Keller JR: Cell-nonautonomous function of Id1 in the hematopoietic progenitor cell niche
Blood 114: 1186-1195 (**2009)**

95. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T: Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival
Cancer Res 64: 3753-3756 (**2004**)

96. Tam WF, Gu TL, Chen J, Lee BH, Bullinger L, Fröhling S, Wang A, Monti S, Golub TR, Gilliland DG: Id1 is a common downstream target of oncogenic tyrosine kinases in leukemic cells
Blood 112: 1981-1992 (**2008**)

97. Tamburini J, Chapuis N, Bardet V, Park S, Sujobert P, Willems L, Ifrah N, Dreyfus F, Mayeux P, Lacombe C, Bouscary D: Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin-like growth factor-1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways
Blood 111: 379-382 (**2008**)

98. Tang R, Hirsch P, Fava F, Lapusan S, Marzac C, Teyssandier I, Pardo J, Marie JP, Legrand O 2009: High Id1 expression is associated with poor prognosis in 237 patients with acute myeloid leukemia
Blood 114: 2993-3000 (**2009**)

99. Valk PJ, Verhaak RG, Beijen MA, Erpelinck CA, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Boer JM, Beverloo HB, Moorhouse MJ, van der Spek PJ, Löwenberg B, Delwel R: Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia
N Engl J Med 350: 1617-1628 (**2004**)

100. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CDVardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD: The 2008 revision of the World Health Organisation (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rational and important changes
Blood 114: 937-951 (**2009)**

101. Verhaak RG, Wouters BJ, Erpelinck CA, Beverloo HB, Lugthart S, Löwenberg B, Delwel R, Valk PJ: Prediction of molecular subtypes in acute myeloid leukemia based on gene expression profiling
Haematologica 94: 131-134 (**2009**)

102. Vermeer MH, van Doorn R, Dijkman R, Mao X, Whittaker S, van Voorst Vader PC, Gerritsen MJ, Geerts ML, Gellrich S, Söderberg O, Leuchowius KJ, Landegren U, Out-Luiting JJ, Knijnenburg J, Ijszenga M, Szuhai K, Willemze R, Tensen CP: Novel and highly recurrent chromosomal alterations in Sézary syndrome
Cancer Res 68: 2689-2698 (**2008**)

103. Wang Y, Yu Y, Tsuyada A, Ren X, Wu X, Stubblefield K, Rankin-Gee EK, Wang SE: Transforming growth factor-β regulates the sphere-initiating stem cell-like feature in breast cancer through miRNA-181 and ATM
Oncogene 12: 1470-1480 (**2011**)

104. Wouters BJ, Jordà MA, Keeshan K, Louwers I, Erpelinck-Verschueren CA, Tielemans D, Langerak AW, He Y, Yashiro-Ohtani Y, Zhang P, Hetherington CJ, Verhaak RG, Valk PJ, Löwenberg B, Tenen DG, Pear WS, Delwel R: Distinct gene expression profiles of acute myeloid/T-lymphoid leukemia with silenced CEBPA and mutations in NOTCH1
Blood 110: 3706-3714 (**2007)**

105. Wouters BJ, Löwenberg B, Delwel R: A decade of genome-wide gene expression profiling in acute myeloid leukemia: flashback and prospects
Blood 113: 291-298 (**2009a**)

106. Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, van Putten WL, Valk PJ, Delwel R: Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome.
Blood 113: 3088-3091 (**2009b**)

107. Wu S, Zhou B, Xu L, Sun H: IRS-2, but not IRS-1, can sustain proliferation and rescue UBF stabilization in InR or InR defective signaling of 32D myeloid cells
Cell Cycle 8: 3218-3226 (**2009**)

108. Yang L, Wang L, Kalfa TA, Cancelas JA, Shang X, Pushkaran S, Mo J, Williams DA, Zheng Y: Cdc42 critically regulates the balance between myelopoiesis and erythropoiesis
Blood 110: 3853-3861 (**2007**)

109. Yin JQ, Zhao RC, Morris KV: Profiling microRNA expression with microarrays
Trends Biotechnol 26: 70-76 (**2008**)

110. Zeng Y: Principles of micro-RNA production and maturation
Oncogene 25: 6156-6162 (**2006**)

7. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Hartmut Döhner, Direktor der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums Ulm, für die Überlassung des Themas und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen innerhalb seiner Abteilung.

Herrn PD Dr. med. Lars Bullinger danke ich für die umfangreiche Hilfe bei der Einarbeitung in das Thema und bei der Durchführung der Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbietern im Labor für die gute Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und ihre guten Ratschläge bedanken, im Besonderen Frau Annika Russ für ihre Geduld.

8. Lebenslauf

Aus Gründen des Datenschutzes wurde der Lebenslauf in der elektronischen Version entfernt.

9. Eigene Veröffentlichungen

Annika C. Russ, Sandrine Sander, Sonja C. Lück, Katharina M. Lang, Marion Bauer, Frank G. Rücker, Hans Kestler, Richard F. Schlenk, Hartmut Döhner, Karlheinz Holzmann, Konstanze Döhner, and Lars Bullinger.
Integrative *NPM1* mutation-associated miRNA and gene expression pattern analysis identifies novel miRNA - target gene interactions in acute myeloid leukemia.
Manuskript zur Publikation eingereicht.