

Analyse der Expression von microRNAs im hämatopoietischen System

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sandra Weinhold

aus Karl-Marx-Stadt

Düsseldorf, Dezember 2007

Aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr.P.Wernet

Koreferent: Prof. Dr. C. Hollenberg

Koreferent: PD. Dr. M. Uhrberg

Koreferent: Prof. Dr. J. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2008

*Immer weiter, immer weiter gerade aus,
nicht verzweifeln,
denn da holt dich keiner raus,
komm, steh selber wieder auf!*

....

Es gibt so vieles, was wir nicht verstehen.

....

Wir dürfen nicht nur an das glauben, was wir sehn!

...

Wunder geschehen!

(aus „Wunder geschehen“)

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	IV
1	Einleitung	1
1.1	Hämatopoiese	1
1.1.1	Das hämatopoietische System	2
1.1.2	Lymphopoiese	3
1.1.2.1	T-Zellen	3
1.1.2.2	Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)	4
1.1.2.2.1	Subpopulationen der NK-Zellen	5
1.1.3	Myelopoiese	6
1.1.4	Hämatopoietische Stammzelle	7
1.2	MicroRNAs (miRNAs)	9
1.2.1	Biogenese der microRNAs	10
1.2.2	MicroRNAs in embryonalen Stammzellen und der Hämatopoiese	14
1.3	Ziel der Arbeit	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Geräte	16
2.2	Chemikalien	18
2.3	Verbrauchsmaterialien	19
2.4	Puffer und Medien	20
2.4.1	Materialien für Zellkultur	20
2.4.2	Puffer für Molekularbiologie	20
2.5	Antikörper	21
2.6	Biologisches Material	21
2.6.1	Humane Zelllinien	21
2.6.2	Blutproben	22
2.7	Molekularbiologische Reagenzien	22
2.7.1	Oligonukleotide für Northern Blot	22
2.8	Verwendete Software	22
2.9	Internet	23
2.10	Methoden	23
2.10.1	Allgemeine Zellkultur	23
2.10.2	Zellzahlbestimmung	23
2.10.3	Kultivierung von Zellen	24
2.10.3.1	Adhärente Zellen	24
2.10.3.2	Suspensionszellen	24
2.10.3.3	Einfrieren von Zellen	25
2.10.3.4	Auftauen von Zellen	25
2.10.3.5	Isolation von mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation	26
2.10.3.6	Erythrozytenlyse durch Ammoniumchlorid	26
2.10.3.7	Zellisolation unter Verwendung paramagnetischer Microbeads (MACS™)	26
2.10.3.8	Isolation von Granulozyten	27
2.10.3.9	Isolation von Thrombozyten	27
2.10.3.10	May-Grünwald-Färbung	28
2.10.3.11	Durchflusszytometrie	28
2.10.3.12	Färben der Zellen für die Durchflusszytometrie	29

2.10.3.13	Zytokin-Stimulation von primären NK-Zellen	29
2.11	Molekularbiologische Methoden	30
2.11.1	RNA-Isolation	30
2.11.1.1	Isolation von Gesamt-RNA	30
2.11.1.2	Isolation von microRNA	31
2.11.2	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	31
2.11.3	Reverse Transkription	32
2.11.4	Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion	33
2.11.5	Real-Time PCR	33
2.11.6	Auswertung von Real-Time PCR-Ergebnissen	34
2.11.7	Quantifizierung von microRNAs unter Verwendung von TaqMan-basierenden PCR-Assays	36
2.11.7.1	MiRNA-Expressionsanalyse unter Verwendung des 330-Multiplex-Assays	36
2.11.7.2	TaqMan miRNA human panel early access kit – „miRNA-Einzel-PCR-Assay“	40
2.11.8	Gelelektrophoretische Auftrennungen	42
2.11.8.1	Trennung von Nukleinsäuren mittels Agarose-Gelelektrophorese	42
2.11.8.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
2.11.9	Northern Blot	43
2.11.10	Radioaktiv-Markierung der DNA-Gensonden mit γ - ³² P-ATP	44
2.11.11	Hybridisierung mit radioaktiv-markierten Gensonden	44
2.11.12	Nachweis von RNA im Anschluss an die Polyacrylamid-Gelelektrophorese	45
2.12	DNA-Chip-Technologie	46
2.12.1	Herstellung von DNA-Chip-Trägern (Microarrays)	46
2.12.1.1	Produktion von Amin-aktivierten Objektträger	47
2.12.1.2	Präparation der Oligonukleotide für das Spotten	47
2.12.1.3	Herstellung von Microarrays	48
2.12.2	Post-Hybridisierungsschritte	49
2.12.3	Fluoreszenzmarkierung der RNA	50
2.12.4	DNA-Chip-Hybridisierung	50
2.12.5	Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von DNA-Chips	51
2.12.6	Statistische Auswertungen	52
2.12.6.1	Cluster-Analyse	52
2.12.6.2	Vennendiagramm	53
3	Ergebnisse	55
3.1	Entwicklung einer Microarray-Plattform zur Analyse der miRNA-Expression	55
3.1.1	Sensitivität der miRNA-Chips	56
3.1.2	Spezifität der miRNA-Chips	57
3.1.3	Analyse der miRNA-Expression in hämatopoietischen Zellen unter Verwendung der Microarray-Technologie	60
3.2	Etablierung des 330-miRNA-Multiplex PCR-Assays	62
3.2.1	Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit des 330-Multiplex-Assay	62
3.2.2	Spezifität des 330-Multiplex PCR-Assays	71
3.2.3	Etablierung einer geeigneten Normalisierungsmethode für den 330-Multiplex-Assay	75
3.3	MiRNA-Expressionsprofile in diversen Zellpopulationen im Verlauf der Hämatopoese	78
3.3.1	Isolation der verschiedenen hämatopoietischen Zellpopulationen	78

3.3.2	miRNA-Profile im Verlauf der Hämatopoiese	83
3.3.2.1	MiRNA-Expressionsunterschiede zwischen humanen ES-Zellen, HSC und HPC	87
3.3.2.2	Reduktion des miRNA-Repertoires in determinierten HPCs (CD34 ⁺ CD38 ⁺ lin ⁺)	91
3.3.2.3	Lymphoide Zellpopulationen weisen nur schwache miRNA-Expressionsunterschiede auf	93
3.3.2.4	miRNA-Profile in myeloiden Zellpopulationen	97
3.3.2.5	Vergleich der miRNA-Profile in lymphoiden und myeloiden Zellen	101
3.3.3	MiRNA-Expressionsprofile in NK-Zellpopulationen	102
3.3.3.1	Spezifische miRNA-Expression in Subpopulationen von NK-Zellen aus peripherem Blut	102
3.3.3.2	Unterschiede in der miRNA-Expression in Subpopulationen zwischen neonatalen und adulten NK-Zellen	104
3.3.3.3	Änderung der miRNA-Expression in primären NK-Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen	109
3.3.3.4	Einfluss verschiedener Zytokine auf die miRNA-Expression von NK-Zellen	114
3.4	Vorhersage potentieller Zielgene (Target-Prediction)	117
3.4.1	Target-Gene für miR-1 und miR-218	117
3.4.2	Target-miRNAs für NK-Oberflächenmarker	120
3.4.3	Target-miRNAs für NKG2D in NK-Zellen	123
3.5	miRNA-Expression im Verlauf der neuralen Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen	125
4	Diskussion	127
5	Zusammenfassung	141
6	Literaturverzeichnis	143

Danksagung
Eidesstattliche Erklärung

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
as	antisense
ATP	Adenosin-5-triphosphat
b	Base
bp	Basenpaare
bidest	doppelt destilliert
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	Differenzierungscluster (Cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre (complementary) DNA
CMV	Cytomegalovirus
Ct	Grenzyklus bei Real-Time PCR (threshold cycle)
d	Tag (day) oder Desoxy-
d.h.	das heißt
dHPC	determinierte hämatopoietische Vorläuferzelle (determined hematopoietic stem cell)
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosid Triphosphat
ds	doppelsträngig (double stranded)
DTT	Dithio-1,4-threithol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alias, lateinisch: und andere
FACS	fluoreszenzaktivierte Zell-Erkennung (Sortierung) (fluorescence activated cell sorting)
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)

FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	forward scatter
g	Gramm oder Gravitationskonstante ($9,81 \text{ m/s}^2$)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (granulocyte colony-forming factor)
GPS	3-Glycidoxypropyl-trimethoxysilane
GTP	Guanosin-triphosphat
h	Stunde oder human
HLA	humanes Leukozytenantigen (human leukocyte antigen)
HPC	Hämatopoietische Vorläuferzelle (hematopoietic progenitor cell)
HSC	Hämatopoietische Stammzelle (hematopoietic stem cell)
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ITAM	immunoreceptor tyrosin-based activating motif
ITIM	immunoreceptor tyrosin-based inhibiting motif
KIR	Killer cell immunoglobulin-like receptor
l	Liter
log	Logarithmus
M	Molar
mA	Milliampere
MACS	Magent-vermittelte Zellsortierung (magnet activated cell sorting)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min	Minute(n)
mg	Milligramm
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mM	Millimol
MNC	Mononukleäre Zellen (mononuclear cells)
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
NCAM	Neurales Zelladhensionsmolekül (neural cell adhesion molecule)
ng	Nanogramm
NK	natürliche Killerzelle (natural killer cell)

OD	optische Dichte
p	Piko
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphat buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PE	Phycoerythrin
pmol	picomol
POL	Polymerase-Protein
Poly(A)	Polyadenylierungssignal
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNAi	RNA interference
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Kulturmedium aus dem „Roswell Park Memorial Institute“
RT	reverse Transkriptase, Raumtemperatur
s. Kap.	siehe Kapitel
SCID	severe combined immunodeficiency; schwere, kombinierte Immundefizienz
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
sec	Sekunde(n)
shRNA	kurze Haarnadel-Struktur RNA (short hairpin RNA)
siRNA	small interfering RNA
s.o.	siehe oben
ss	einzelsträngig (single stranded)
SSC	seitwärts gerichtetes Streulicht (side scatter)
stRNA	short temporal RNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylamin
TBE	Tris-Borat-Puffer
TCR	T-Zellrezeptor (T cell receptor)
TE	Tris-EDTA
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (transforming growth factor)
Tm	Schmelztemperatur
TNF	Tumor Nekrose Faktor

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität (Unit)
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
UTR	nicht translatierter Bereich (untranslated region)
UV	ultraviolett
V	Volt
v	Volumen (volume)
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
w	Gewicht (weight)
z.B.	zum Beispiel
μ	Mikro-

1 Einleitung

1.1 Hämatopoiese

Die Hämatopoiese bezeichnet die Bildung und Entwicklung der Blutzellen. Während der Entwicklung des hämatopoietischen Systems entwickeln sich Vorläuferzellen im splanchnopleuralen Mesoderm, welches zur sogenannten AGM-Region (Aorta, Gonaden und Mesonephron) wird, sowie in der Plazenta (Gekas et al., 2005; Medvinsky et al., 1993; Ottersbach and Dzierzak, 2005). Im weiteren Verlauf der embryonalen Hämatopoiese siedeln sich die aus der AGM-Region und der Plazenta hervorgegangenen hämatopoietischen Stammzellen (*hematopoietic stem cell*, HSC) in der fötalen Leber und im Knochenmark an (Dzierzak, 2002; Moore and Metcalf, 1970; Muller et al., 1994). *In vitro* Versuche zeigten, dass es zwei getrennte Phasen der Entstehung des hämatopoietischen Systems gibt: Erstens eine primitive Phase, welche vom Dottersack ausgeht, und zweitens die definitive Phase der Hämatopoiese, die vom splanchnopleuralen Mesoderm bzw. der AGM-Region ausgeht (Cumano et al., 1996; Medvinsky and Dzierzak, 1996; Robb and Elefanty, 1998). Bei Langzeit-Rekonstituierungsexperimenten unter Verwendung von Stammzellen aus der AGM-Region, der fötalen Leber und aus Knochenmark konnte das gesamte hämatopoietische System bestrahlter Mäuse repopuliert werden. Demnach handelt es sich bei den Stammzellen aus den drei verschiedenen Regionen um funktional äquivalente Zellpopulationen (Jordan et al., 1990; Medvinsky et al., 1993; Muller et al., 1994). In Abhängigkeit von der Zugehörigkeit zum embryonalen, fötalen oder adulten hämatopoietischen System sowie dem Entwicklungsstadium werden verschiedene Zellpopulationen gebildet (Bonifer et al., 1998). So weisen Stammzellen aus verschiedenen Entwicklungsstadien Unterschiede in der Expression von Oberflächenantigenen (Ikuta et al., 1990; Kantor et al., 1992; Trevisan and Iscove, 1995) und transkribierten Genvarianten auf (Russell, 1979).

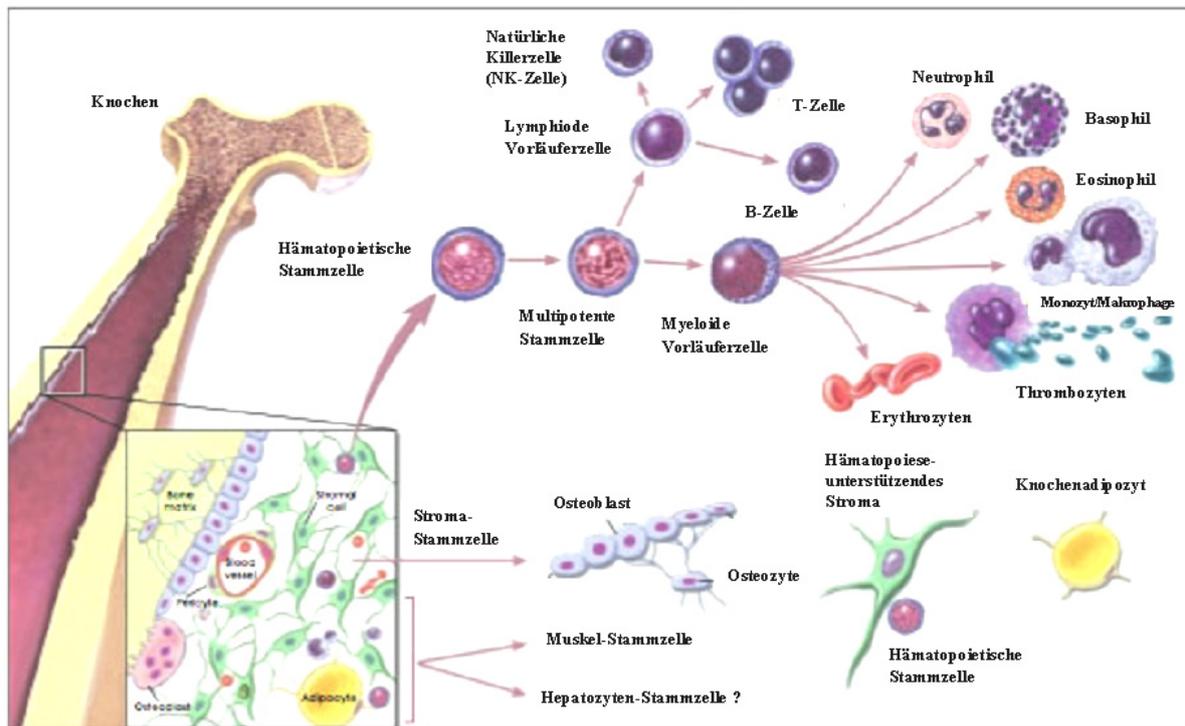


Abb. 1.1: Schema der Differenzierung von hämatopoietischen sowie Stroma-Stammzellen.
(Modifiziert von stemmcells.nih.gov; © 2001 Winslow und Kibiuk)

1.1.1 Das hämatopoietische System

Das humane Blut setzt sich zu etwa 45% aus verschiedenen Blutzelltypen und zu 55% aus Blutplasma zusammen, wobei die zellulären Blutbestandteile das hämatopoietische System repräsentieren und aufgrund ausdifferenzierter Zellpopulationen in mehrere Linien untergliedert werden können. Eine erste Unterteilung ermöglicht die Klassifizierung der Leukozyten (weisse Blutkörperchen), Thrombozyten (Plättchen) und Erythrozyten (rote Blutkörperchen).

Die Leukozyten gliedern sich wiederum in die lymphozytären (T-, B- und NK-Zellen) und die myeloiden Zelltypen (Granulozyten, Monozyten und dendritische Zellen); sie sind wesentliche Bestandteile der körpereigenen Abwehr.

1.1.2 Lymphopoiese

Im Verlauf der Lymphopoiese durchlaufen die unterschiedlichen Zelltypen verschiedene Stadien der Differenzierung, bis sie ihre volle Reife erlangen. Dies beinhaltet für die T-Zellen vor allem die Bildung funktionsfähiger Antigen-Rezeptoren im Thymus und für die B-Zellen die Fähigkeit, Immunglobuline zu produzieren und auszuschütten (Knochenmark). Die damit einhergehende Interaktion der humoralen, von den B-Zellen segregierten Antikörpern mit löslichen Antigenen und das Erkennen MHC (*major histocompatibility complex*)-restringierter Antigene auf antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cell*, APC) oder infizierten Körperzellen durch spezifische Rezeptoren auf der T-Zelloberfläche stellt den Schlüsselmechanismus der erworbenen Immunität (spezifische Abwehr) dar.

Die dritte lymphoide Zellreihe – die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) – weisen keine antigenspezifischen Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche auf. Sie dienen dem schnellen Erkennen und Abtöten abnormaler Zellen (Tumorzellen und virusinfizierter Zellen) und sind deshalb wichtige Komponenten der angeborenen (unspezifischen) Immunabwehr gegen intrazelluläre Pathogene.

1.1.2.1 T-Zellen

Die T-Zellen tragen alle den T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor*, TCR) auf ihrer Oberfläche, welche die antigenerkennende Einheit darstellt und immer im Komplex mit CD3-Molekülen vorliegt. In Abhängigkeit von der Expression des Korezeptors CD4 (*cluster of differentiation*, Differenzierungscluster) oder CD8 kann dieser Zelltyp in CD4-positive T-Zellen (Helferzellen) oder CD8-positive T-Zellen (zytotoxische T-Zellen) unterteilt werden.

Eine wichtige Funktion der zytotoxischen T-Zelle ist das Abtöten viral infizierter Zellen. Dies geschieht durch die Präsentation viraler Antigene auf infizierten Körperzellen. Dabei interagiert der TCR und der Korezeptor CD8 mit Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC), welcher auch als Humanes Leukozyten Antigen-System (HLA) bezeichnet wird (Klein, 1990). Die MHC-Klasse-I-Moleküle körpereigener Zellen präsentieren den CD8⁺ T-Zellen Antigen-spezifische Peptide, die intrazellulären Ursprungs wie sind (Germain, 1994) und lösen

dadurch die Ausschüttung von Perforin und Granzyme aus, was die infizierte Zellen in die Apoptose (programmierter Zelltod) treibt.

Im Gegensatz zu den zytotoxischen T-Zellen erkennen $CD4^+$ T-Helferzellen Antigene extrazellulären Ursprungs, welche auf MHC-Klasse-II-Molekülen antigenpräsentierender Zellen (Dendritische Zellen und B-Zellen, Makrophagen) dargeboten werden. Je nach Art ihrer Immunantwort werden die $CD4^+$ T-Zellen in T_H1 - und T_H2 -Zellen unterteilt.

T_H1 -Zellen steuern eine zelluläre Immunantwort durch die Produktion und Ausschüttung von Zytokinen wie $INF-\gamma$ (Interferon-gamma) oder IL-2 (Interleukin-2), welche zur Aktivierung von Makrophagen und Proliferation von zytotoxischer T-Zellen führt. Gleichzeitig wird die Immunantwort der T_H2 -Zellen durch die segregierten Zytokine inhibiert. Hauptsächlich werden durch eine T_H1 -Zellen gesteuerte Immunreaktion intrazelluläre Infektionen bekämpft, welche durch Bakterien und Viren verursacht werden.

Im Gegensatz dazu steuern T_H2 -Zellen eine humorale Immunantwort. Dies bedeutet, neben der Ausschüttung von $TNF-\beta$ (Tumornekrosefaktor-beta) und IL-10 auch von IL-4, was zu einer Aktivierung von B-Zellen führt und in der Antikörperproduktion resultiert. Parallel dazu führt die Ausschüttung dieser Zytokine zu einer Hemmung der T_H1 -Zellentwicklung und der Makrophagenaktivierung.

1.1.2.2 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Unter den Lymphozyten nehmen die NK-Zellen eine Sonderstellung ein, da sie nicht wie die T- und B-Zellen zu den Modulatoren der adaptiven Immunität gezählt werden können. Vielmehr sind NK-Zellen eine wichtige Komponente der angeborenen Immunität und zeichnen sich durch das Abtöten infizierter Körper- sowie Tumorzellen ohne vorherige antigene Stimulation aus, was ihnen eine rasche Abwehrreaktion ermöglicht. Dieser Fähigkeit verdanken sie den Namen „natürliche Killerzellen“, (Kiessling et al., 1975a; Kiessling et al., 1975b). Die morphologisch sehr granulären Lymphozyten - deshalb auch LGL genannt (*large granular lymphocytes*, (Timonen et al., 1981) - werden phänotypisch aufgrund ihrer Oberflächenantigene von den anderen lymphozytären Zelltypen unterschieden. NK-Zellen sind durch die Expression der spezifischen CD (*cluster of differentiation*)-Moleküle CD56

(*neural cell adhesion molecule*, NCAM), CD16 (FcRIII α) und die Abwesenheit von CD3 charakterisiert (Rees, 1990). Die zytotoxische Aktivität der NK-Zelle jedoch wird durch die Interaktion verschiedener NK-Zell-Rezeptoren mit Liganden auf der Zielzelle vermittelt.

Die Rezeptoren der NK-Zellen können in zwei Gruppen unterteilt werden. KIR (*killer immunoglobulin-like receptors*) gehören der Klasse der Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren an, während die Moleküle der NKG2-Familie zu den lektinartigen Rezeptoren gehören (*killer lectin-like receptors*, KLR). In beiden Familien gibt es sowohl inhibierende als aktivierende Rezeptoren (Lanier, 1998a; Lanier, 1998b). Im Gegensatz zu den Effektormolekülen der T- und B-Zellen unterliegen die Rezeptoren der NK-Zellen jedoch keinem somatischen Genrearrangement (Moretta et al., 2002a; Moretta et al., 2002b).

1.1.2.2.1 Subpopulationen der NK-Zellen

Im humanen Blutsystem können die NK-Zellen in zwei Subpopulationen unterteilt werden. Die Unterscheidung erfolgt aufgrund der Stärke von CD56 (N-CAM), CD16 (FC γ RIII) sowie der KIR auf der Zelloberfläche. Mit 90 bis 95% repräsentieren die NK-Zellen mit einer schwächeren CD56-Expression den grössten Teil dieser Population und werden als CD56^{Dim} NK-Zellen bezeichnet. Diese Zellen exprimieren neben CD56 auch CD16 und KIRs auf ihrer Oberfläche (Cooper et al, 2001). Untersuchungen des Zytokinstatus der CD56^{Dim}CD16⁺ NK-Zellen zeigte eine geringe INF- γ -Aktivität (Interferon-gamma) und keine Produktion von TNF- β (Tumornekrosefaktor) an. Allerdings produziert diese NK-Zellpopulation eine grosse Menge an Perforin und Granzyme. Aufgrund dieser Eigenschaften, die ihnen eine starke und rasche zytotoxische Aktivität ermöglichen, werden diese Zellen als die zytotoxische NK-Zellen betrachtet (Fehniger et al., 2003; Ferlazzo G, 2004; Hanna J, 2004; Hanna et al., 2003; Jacobs R, 2001; Jacobs et al., 1992). Den weitaus geringeren Anteil der NK-Zellen in der Peripherie machen die sogenannten CD56^{Bright} NK-Zellen aus. Die Nomenklatur beruht auf einer erhöhten Expression von CD56 auf der Zelloberfläche dieses Zelltyps. Die CD56^{Bright} Zellen tragen auf ihrer Zelloberfläche keine Rezeptoren für CD16 und/oder KIR und haben somit keine zytotoxische Aktivität. Allerdings wurde in diesem Zelltyp eine stark erhöhte Produktion von INF- γ und TNF- β beobachtet (Fehniger et al., 2003; Hanna J, 2004; Jacobs R, 2001). Die beschriebenen und in Tabelle 1.1 dargestellten Proteinexpressionsunterschiede

konnten anhand von cDNA-Micoarrays auch auf Transkriptionsebene bestätigt werden (Hanna et al, 2004, Wendt et al., 2006).

Tabelle 1.1: Unterschiede zwischen den NK-Zellsubpopulationen

	CD56 ^{bright}	CD56 ^{dim}
% der NK-Zellen	10	90
NK-Phänotyp		
CD56	+++	+
CD16	+/-	+++
KIR	+/-	+++
Cytokin-Produktion		
INF- γ	+++	+/-
TNF- α/β	+++	-
Zytotoxizität	-	+++

1.1.3 Myelopoiese

Die myeloiden Zelltypen untergliedern sich in Granulozyten (Mikrophagen) und Monozyten (Makrophagen). Beide Zelltypen sind ebenfalls Komponenten des angeborenen Immunsystems.

Granulozyten werden im Knochenmark gebildet und ins Blut abgegeben und können in drei Subpopulationen unterteilt werden. Die neutrophilen Granulozyten sind wie die Monozyten zelluläre Effektoren der Phagozytose (Töten von Viren, Bakterien und Pilzen im Blut) und stellen so einen Teil der angeborenen Immunabwehr dar. Die eosinophilen sowie basophilen Granulozyten dienen der Freisetzung von Entzündungsmediatoren zur Abwehr von Parasiten, können aber auch allergische Reaktionen auslösen.

Die Thrombozyten (Blutplättchen) dienen der Blutgerinnung sowie dem Abdichten der Blutgefäße und weisen eine durchschnittliche Lebensdauer von 8-12 Tagen auf. Im Verlauf ihre Reifung (Thrombopoese) beginnt die sogenannte myeloische Stammzelle (Hämozytoblast) Rezeptoren für Thrombopoetin zu entwickeln und in eine neue Zelle, dem Megakaryoblasten zu differenzieren. Als Reaktion auf das Thrombopoetin repliziert dieser thrombozytäre Zelltyp seine DNA mehrfach, jedoch erfolgt dabei keine Kern- und

Zellteilung. Das sich anschließende Zellstadium – der Megakaryozyt – weist dadurch das Merkmal der Polyploidie auf, d.h. das Vorhandensein mehrerer Zellkerne und multipler Chromosomensätze. Die finalen Thrombozyten entstehen durch die Fragmentierung (Abschnürung) der polyploiden Zellen im Knochenmark und einem einhergehendem Verlust des Zellkerns.

Die Erythrozyten werden im Rahmen der Erythropoese gebildet, welche vor der Geburt hauptsächlich im Dottersack, der Milz und Leber stattfindet und sich nach der Geburt vorwiegend ins Knochenmark verlagert. Diese Zellen transportieren den an das Hämoglobin gebundenen Sauerstoff in die diversen Gewebe und Organe des Körpers und besitzen eine Lebensdauer von etwa 120 Tagen.

Infolge der relativ kurzen Lebensdauer der verschiedenen Blutzellen handelt es sich bei dem hämatopoietischen System um ein sehr regeneratives Organ des Körpers. Die Aufrechterhaltung der Homöostase, welche durch Zelltod, Proliferation und Differenzierung beeinflusst wird, erfolgt durch die Selbsterneuerung hämatopoietischer Stammzellen oder der Differenzierung derselben in einen der oben genannten Blutzelltypen.

1.1.4 Hämatopoietische Stammzelle

Die hämatopoietische Stammzelle (*hematopoietic stem cell*, HSC) ist eine aus dem Knochenmark stammende Zelle, die zwei wichtige Eigenschaften aufweist: Sie kann alle reifen hämatopoietischen Zellen bilden und sich selbst erneuern, wodurch sie eine konstante Quelle für die Blutzellen im Lebenszyklus eines Menschen darstellt (Nakauchi, 1998). Diese Aktivitäten ermöglichen eine Langzeitrepopulation des Knochenmarks nach Transplantationen mit HSCs (Civin et al., 1996a). In den vergangenen 30 Jahren konnte anhand einer Vielzahl von Transplantationsexperimenten gezeigt werden, dass sowohl neonatale als auch adulte hämatopoietische Stammzellen in der Lage sind, über die Blutbahn ins Knochenmark zu wandern und dort das komplette hämatopoietische System zu rekonstituieren (Weissman, 2000). Im Zuge der Differenzierung bilden sich aus den multipotenten HSCs die weniger primitiven hämatopoietischen Vorläuferzellen (*hematopoietic progenitor cell*, HPC (Rodgers et al., 2000)), die in lymphatische und

myeloische Vorläuferzellen (*determined hematopoietic progenitor cell*, dHPC) differenzieren und ihrerseits dann über verschiedene Entwicklungsstufen in reife Blutzellen ausreifen (Akashi et al., 2000; Kondo et al., 1997; Metcalf, 1998).

Die adulte hämatopoietische Stammzelle ist aufgrund ihrer relativ guten Zugänglichkeit der am besten untersuchte Stammzelltyp des Menschen. Als Quellen für die hämatopoietischen Stammzellen dienen das Knochenmark (*bone marrow*, BM), die Plazenta, die fetale Leber, Nabelschnurblut (*cord blood*, CB) oder mittels Wachstumsfaktoren mobilisiertes peripheres Blut. Im letzten Fall führt die Stimulation mit dem Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor (*Granulocyte-Colony Stimulation Factor*, G-CSF) zu einer Mobilisation der hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark und im Anschluss zur Loslösung der Zellen aus dem Knochenmark und Einwanderung in das periphere Blut.

Die Zellen der hämatopoietischen Stammzellfraktion lassen sich bislang nicht einem spezifischen Phänotyp zuordnen. Jedoch exprimieren diese Zellen immunologische Oberflächenmarker wie z.B. CD34, CD38 und CD133. Dies sowie das Fehlen von Hämatopoiese-spezifischen Oberflächenantigenen (*lineage-negative*, Lin⁻) ermöglichen eine Eingrenzung der stammzellerhaltenden Zellen, sowie die Unterteilung in die verschiedenen Stammzelltypen. Im Menschen exprimieren alle Zellen der hämatopoietischen Stammzellpopulationen das Phosphoglykoprotein CD34 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene (Krause et al., 1996), während CD38 (ADP-Ribosyl-Cyklase) eine unterschiedliche Frequenz auf den Zellen aufweist. Demnach handelt es sich bei der hämatopoietischen Stammzellfraktion um eine heterogene Zellmischung, die jedoch mit Hilfe des Zelloberflächenantigens CD38 in zwei Subpopulationen der CD34⁺-Zellen unterteilt werden kann, nämlich in primitivere Zellen, welche eine geringe bzw. keine Expression für CD38 aufweisen (CD38^{-/low}) und Zellen, die deutlich positiv für CD38 (CD38⁺) sind und somit nicht mehr das volle Stammzellpotential besitzen.

Man schätzt, dass nur 0,5 bis 1% der Zellen in der CD34⁺-Population tatsächlich HSCs sind, die sich durch die Expression von CD34⁺CD38^{-/low}Lin⁻ auf der Zelloberfläche auszeichnen. Verschiedene Publikationen zeigen, dass diese Fraktion der CD34⁺CD38^{-/low}-Zellen (HSCs) für die primitiven hämatopoietischen Stammzellen angereicht sind (Bhatia et al., 1997).

Die reiferen hämatopoietischen Vorläuferzellen (HPCs) zeigen neben CD34 eine starke CD38-Expression und eine im Vergleich zu den unreiferen HSCs erhöhte Proliferationsrate (Brummendorf et al., 1998; Civin et al., 1996b; Mayani et al., 1993a; Mayani et al., 1993b).

Ein weiterer Oberflächenmarker, der zur Separation der hämatopoietischen Stammzellen verwendet wird, ist CD133 (AC133, Prominin, Kobari et al., 2001). Damit kann die Population der hämatopoietischen Stamm-Vorläuferzellen (*hematopoietic stem-progenitor cell*, HSPC) angereichert werden. Allerdings ist diese Population im Menschen weniger gut charakterisiert als in der Maus.

Die Differenzierung der hämatopoietischen Stammzelle in einen bestimmten Blutzelltyp geht mit einer starken Modifikation der Gen- und Proteinexpressionsprofile einher. Diese Regulation muss über verschiedene Mechanismen gesteuert werden. Neben der Kontrolle durch Transkriptionsfaktoren und der Regulation auf epigenetischer Ebene konnte in letzter Zeit gezeigt werden, dass nicht-kodierende RNAs hierbei eine wichtige Rolle spielen.

1.2 MicroRNAs (miRNAs)

MicroRNAs (miRNAs) repräsentieren eine große Familie von kleinen (17 bis 25 Nukleotiden kurzen) RNA-Molekülen, die nicht für Proteine kodieren und durch die Interaktion mit messengerRNA (mRNA) die Translation in Pflanzen, Säugetieren und auch einigen Viren regulieren (Bartel, 2004; Mallory and Vaucheret, 2006; Pfeffer et al., 2005; Sontheimer and Carthew, 2005; Wernet, 2006).

Die erste beschriebene miRNA war *lin-4* (*abnormal cell LINEage*); ein Gen, von dem bekannt war, dass es in den zeitlichen Verlauf der Entwicklungsstufen von *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) steuert (Lee et al., 1993). Statt jedoch in ein Protein prozessiert zu werden, wurden zwei kleine RNA-Moleküle produziert. Eine RNA mit einer Länge von 22 Nukleotiden (nt) und ein zweites, längeres RNA-Molekül mit 61 nt, das als Vorläuferstruktur des kürzeren vermutet wurde. Zeitgleich konnte in den Laboren von Ambros und Ruvkun beobachtet werden, dass diese *lin-4* RNAs eine antisense-Komplementarität zu multiplen Sequenzen im 3'-untranslatierten Bereich (3'*untranslated region*, UTR) des *lin-14*-Gens hat (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Diese Sequenzkomplementarität fiel genau in den Bereich des 3'UTR, in dem die Unterdrückung der *lin-14*-Proteinsynthese durch das *lin-4*-Genprodukt vermutet wurde (Wightman et al., 1991).

Zunächst wurden jedoch keine Hinweise auf eine *lin-4*-ähnliche RNA in anderen Spezies und auch keine weiteren nicht-kodierenden RNAs innerhalb der Nematoden gefunden. Dies

änderte sich erst mit der Entdeckung von *let-7*, einem RNA-Molekül, dass wie *lin-4* die Transition des Larven- in das Erwachsenenschicksal von *C. elegans* in einem späteren Schritt unterstützt (Reinhart et al., 2000; Slack et al., 2000). Es konnten homologe *let-7*-Gene im Menschen und der Fliege identifiziert und die *let-7*-RNA nachgewiesen werden (Pasquinelli et al., 2000).

Inzwischen ist bekannt, dass auch *lin-4* ein Mitglied einer abundanten Klasse von kleinen, regulatorischen RNAs ist, welche als microRNA oder miRNAs bezeichnet werden. Sie sind evolutionär hochkonserviert und konnten in allen untersuchten Höheren Eukaryonten - sowohl in Säugetieren als auch Pflanzen – und einigen Viren nachgewiesen werden (Ambros and Lee, 2004; Bartel and Chen, 2004; Baulcombe, 2004; Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001; Nair and Zavolan, 2006; Pasquinelli et al., 2000). Die miRNA-vermittelte Genregulation ist für viele Spezies und zelluläre Prozesse gezeigt worden, so der Einfluss der miRNAs in die Kontrolle der Zellproliferation, des Zelltods und des Fettmetabolismus (Brennecke et al., 2003; Xu et al., 2003), in die Neuralentwicklung von Nematoden (Johnston and Hobert, 2003), in die Modulation der Differenzierung in hämatopoietische Zelllinien (Chen et al., 2004) sowie auch auf die Entwicklung von Blättern und Blüten der Pflanzen (Aukerman and Sakai, 2003; Emery et al., 2003; Palatnik et al., 2003).

1.2.1 Biogenese der microRNAs

Die genomische Anordnung der miRNA-Gene, sowie Details der Biogenese und der Zielerkennungsmechanismen konnten kürzlich aufgeklärt werden (Bartel, 2004; Cullen, 2004a; Cullen, 2004b; Du and Zamore, 2005; Meister and Tuschl, 2004).

So sind miRNA-Gene entweder weit entfernt von annotierten Genen in genomischen Clustern organisiert oder als individuelle Gene auf dem Genom lokalisiert (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001). Während sie über eigene, unabhängige Transkriptionseinheiten verfügen, gibt es jedoch auch miRNAs, welche in Protein-kodierenden Einheiten lokalisiert sein können (Aravin et al., 2003; Lagos-Quintana et al., 2003; Lai et al., 2003; Lim et al., 2003; Smalheiser, 2003) Diese miRNAs machen etwa ein Viertel aller humanen miRNA-Gene aus und werden nicht von einem eigenen Promotor transkribiert, sondern im Verlauf der Transkription des Protein-kodierenden Gens prozessiert (Baskerville and Bartel, 2005).

Mit Ausnahme einiger viraler miRNAs (Pfeffer et al., 2005) werden die miRNA-Gene von der RNA-Polymerase II (RNA-Pol II) transkribiert und in die sogenannte primäre miRNA (*primary miRNA*, pri-miRNA) prozessiert (Cai et al., 2004; Lee et al., 2002; Lee et al., 2004). Das etwa 100 nt lange pri-miRNA-Transkript weist die klassischen Charakteristika von Protein-kodierenden mRNAs auf, d.h. am 5'-Ende eine m⁷G-Kappenstruktur (Phosphodiesterbindung und Methylierung des Guanins an Position 7 während der Transkription) und am 3'-Ende einen PolyA-Schwanz. Anschliessend wird das pri-miRNA-Transkript im nukleären Mikroprozessor-Komplex in ein 60 bis 70 nt langes miRNA-Vorläufermolekül (*precursor miRNA*, pre-miRNA) modifiziert (Lee et al., 2002; Zeng and Cullen, 2003). Dieser Protein-Komplex besteht aus der RNase III-Endonuklease Drosha und dem doppelsträngige RNA-bindenden Protein (dsRBP) DGCR8 (DeGeorge critical region-8, auch Pasha genannt). Während DGCR8 mit Drosha interagiert und dieses zu den pri-miRNA-Transkripten leitet (Denli et al., 2004; Gregory, 2004; Han, 2004; Landthaler et al., 2004), schneidet Drosha beide Stränge in der Nähe des Stammes, wodurch die pre-miRNA mit der typischen *stem-loop*-Struktur entsteht (Basyuk et al., 2003; Lee et al., 2003). Dieses miRNA-Intermediat wird aktiv aus dem Zellkern durch den Rezeptor Exportin-5 und Ran-GTP ins Zytoplasma transportiert (Bohnsack et al., 2004; Lund et al., 2004; Yi et al., 2003).

Im nächsten Schritt der Maturierung werden die pre-miRNA-Moleküle durch Dicer, ebenfalls eine RNase III-Endonuklease, in reife miRNAs prozessiert (Bernstein et al., 2001; Grishok et al., 2001; Hutvagner, 2001; Ketting, 2001; Lee et al., 2003). Dicer erkennt dabei den doppelsträngigen Bereich sowie die 2 Nukleotide des 3'-Überhangs der Vorläufer-miRNA und verkürzt diese in die etwa 22 nt lange Duplexstruktur miRNA:miRNA*, die aus der reifen miRNA und dem gegenüberliegenden Strang der pre-miRNA (miRNA*) besteht (Filipowicz et al., 2005; Zamore and Haley, 2005; Zhang et al., 2004). Auch für die miRNA-Reifung durch Dicer ist ein dsRBP essentiell. TRBP (*human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein*) interagiert mit Dicer und dirigiert dadurch dessen Aktivität (Chendrimada et al., 2005).

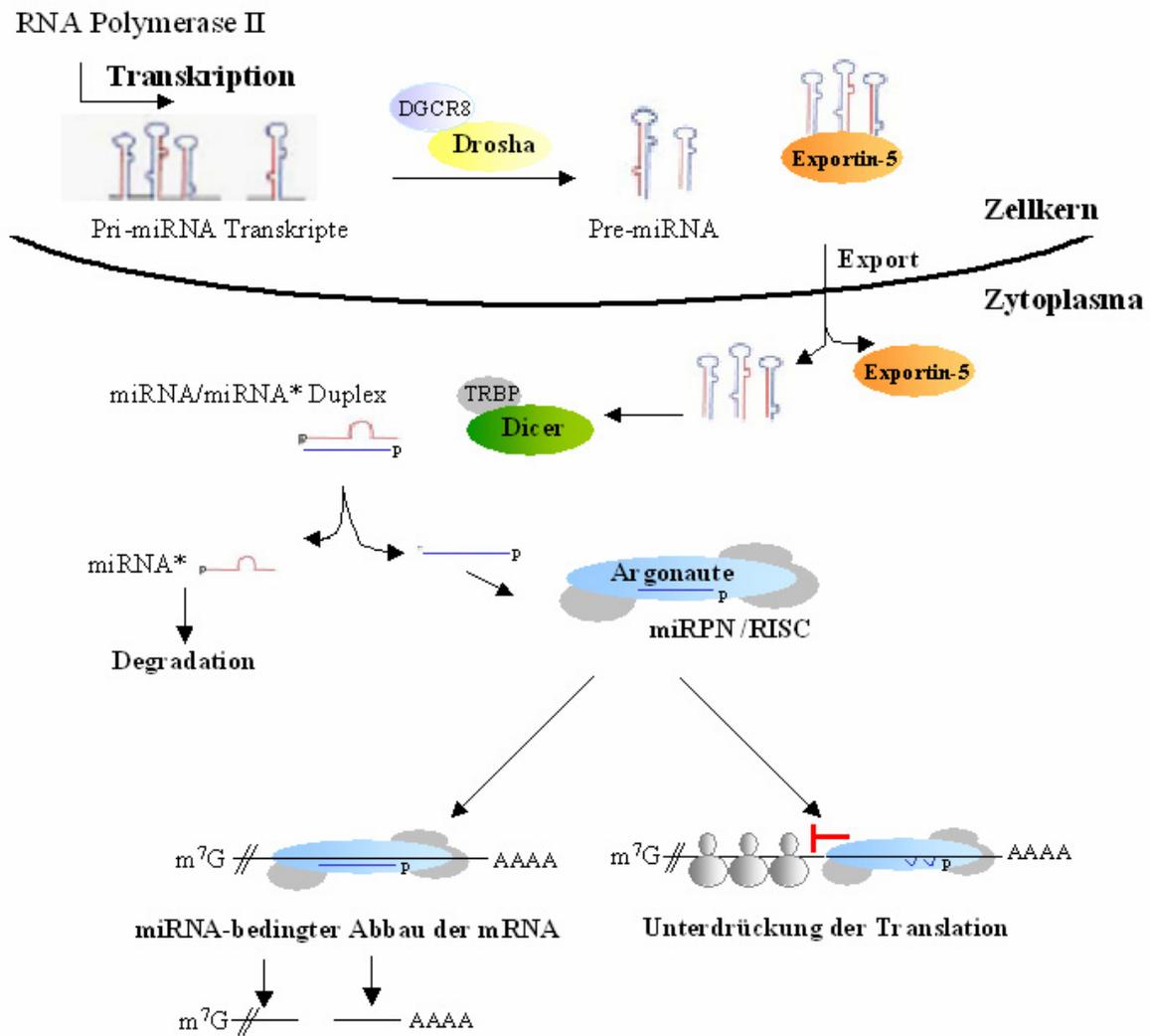


Abb. 1. 2: Schematische Darstellung der miRNA-Transkription und miRNA-Reifung sowie die durch die miRNAs vermittelte posttranskriptionale Reprimierung der Genexpression. (Modifiziert nach Chen and Meister, 2005).

Das kurzlebige miRNA:miRNA*-Zwischenprodukt wird entwunden und der einzelsträngige, reife miRNA-Strang (miRNA, *guide strand*) in den *RNA induced silencing complex* (RISC) – auch miRNP (*microribonucleoprotein*) genannt – transferiert, während der Strang vom gegenüberliegenden Arm (miRNA*, *anti-guide strand* oder *passenger strand*) bis auf wenige Ausnahmen degradiert wird (Mourelatos et al., 2002; Parker and Barford, 2006; Peters and Meister, 2007). Die Entscheidung, welcher der beiden komplementären Stränge das biologisch funktionale miRNA-Molekül darstellt, hängt von der relativen Stabilität der Enden des Duplexes ab. Der in den RISC eintretende Strang ist in der Regel der, dessen 5'-Ende weniger fest mit dem gegenüberliegenden Strang gepaart ist (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003).

Für einige miRNA-Gene konnte eine vergleichbare Akkumulation beider miRNA-Syntheseprodukte gefunden werden, was vermuten lässt, dass beide funktional aktiv sind (Krichevsky et al., 2003; Lagos-Quintana et al., 2002; Schwarz et al., 2003; Sempere et al., 2003). Diese seltenen Ereignisse können durch eine asymmetrische Beladung des RISC abgestimmt sein. Beide Ende des Duplexes weisen demnach eine äquivalenten Stabilität auf, so dass die Helicase den RISC zwar nur mit jeweils einem Strang des Duplexes belädt, dies aber für beide Stränge mit einer ähnlichen Frequenz durchführt (Schwarz et al., 2003).

Die in den Ribonukleoproteinkomplex RISC geladene miRNA reprimiert dort durch die Bindung an den 3'UTR der mRNAs deren Translation oder induziert durch eine Deadenylierung der mRNA deren Degradation (Pillai et al., 2007). Hauptkomponenten von RISC sind Mitglieder der Argonaute-Familie. Im Menschen existieren vier Argonaute-Proteine (Ago1 bis 4), jedoch nur Ago2 besitzt eine messbare katalytische Aktivität (Liu, 2004; Meister et al., 2004; Rivas et al., 2005; Song et al., 2003). Alle Ago-Proteine besitzen PAZ- (*Piwi-Argonaute-Zwille*) und PIWI-Domänen (Carmell et al., 2002). Die PIWI-Domäne, welche eine erhebliche Homologie zu RNase H aufweist, ermöglicht das durch die kleinen RNAs vermittelte Schneiden der Ziel-RNA (Ma et al., 2005; Parker et al., 2004; Parker et al., 2005; Song et al., 2004; Yuan et al., 2005).

Der Prozess der Erkennung einer Ziel-mRNA, der eine mRNA-Degradation und/oder eine Inhibierung der Translation induziert, ist bisher nicht vollständig verstanden (Bagga et al., 2005; Bartel, 2004; Lim et al., 2005). Es scheint, dass der Grad der Komplementarität das weitere Prozessieren der mRNA bestimmt; so führt eine partielle Komplementarität zu einer Reprimierung der Translation, während eine vollständige Übereinstimmung das Zerschneiden initiiert.

1.2.2 MicroRNAs in embryonalen Stammzellen und der Hämatopoiese

MiRNAs können ein breites Spektrum regulatorischer und entwicklungspezifischer Mechanismen steuern, unter denen die Differenzierung die hervorstechendste ist. Expressionsanalysen in murinen embryonalen Stammzellen (mES-Zellen) zeigten ein Set von Stammzell-spezifischen miRNAs, deren Expression im Verlauf der Differenzierung von mES-Zellen zu embryoid bodies entweder ausgeschaltet oder erniedrigt wurde und in differenzierten Zelllinien nicht mehr nachweisbar war, während andere miRNA-Transkripte mit zunehmender Reife der Zellen verstärkt nachgewiesen werden konnten (Chen et al., 2007; Houbaviy et al., 2003; Strauss et al., 2006; Tang et al., 2006; Tang et al., 2007).

Eine vergleichbare Situation konnte von (Suh et al., 2004) für humane embryonale Stammzellen (hESC) gezeigt werden.

Untersuchungen der miRNA-Expression in murinen hämatopoietischen Stammzellen spiegelten unterschiedliche Expressionsprofile zwischen hämatopoietischen und nicht-hämatopoietischen Zellen wieder, wobei nur geringfügige Unterschiede in vollständig differenzierten Blutzellen beobachtet werden konnten (Chen et al., 2004; Monticelli et al., 2005). Daten einer globalen Analyse ausdifferenzierter Zellpopulationen der Hämatopoiese konnte kürzlich von Landgraf et al. (Landgraf et al., 2007) unter Verwendung einer Klonierungsmethode publiziert werden. Informationen über die Expression von miRNAs in humanen hämatopoietischen Stammzellen sind sehr limitiert (Georgantas et al., 2007) und konnten bisher nicht für die Stammzell-angereicherten CD34⁺38⁻-Zellen (HSCs), welche mit einer schwachen Frequenz im humanen Blutssystem vorkommen, gezeigt werden.

1.3 Ziel der Arbeit

Untersuchungen an CD34-positiven Zellen sowie hämatopoietischen Zellen lassen die Vermutung zu, dass die Kontrolle der Proteintranslation differenzierungsabhängig durch miRNAs reguliert wird. Obwohl es verschiedene Analysen zu diversen humanen hämatopoietischen Zelltypen gibt, existiert zur Zeit keine signifikante Analyse der miRNA-Expression des hämatopoietischen Systems unter Einbeziehung der Subpopulationen der

hämatopoietischen Stammzelle (Fazi et al., 2005; Felli et al., 2005; Georgantas et al., 2007; Landgraf et al., 2007; Ramkissoon et al., 2006).

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der miRNAs im Rahmen der Differenzierung insbesondere der hämatopoietischen Linie mittels Untersuchungen der miRNA-Genexpression zu analysieren.

Zur Quantifizierung der miRNAs in humanen Blutzellen sollte zunächst eine geeignete Analysemethode entwickelt werden. Dafür wurden zunächst miRNA-Microarrays unter Verwendung der cDNA-Chiptechnologie sowie eine TaqMan-basierenden PCR-Methode etabliert und optimiert.

Für die Identifizierung der miRNA-Signatur wurden primäre Zellen der hämatopoietischen Stammzellfraktion sowie der verschiedenen reifer Leukozyten aus frischem Blut isoliert, aufgereinigt und analysiert. Weiterführend wurde das miRNA-Muster in Subpopulationen der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die verschiedene Reifestadien dieses Zelltyp repräsentieren, untersucht. Vergleichend dazu wurden NK-Zellen aus peripherem Blut erwachsener Spender mit NK-Zellen aus dem Nabelschnurblut Neugeborener *in vivo* und *in vitro* analysiert, um die Frage einer altersbedingten Expression von miRNAs zu beantworten. Durch Änderung der Versuchsbedingungen (Medienzusätze, Kulturdauer) wurde der Einfluss dieser Parameter auf die miRNA-Expression in NK-Zellen untersucht. Abschliessend wurde versucht, differentiell exprimierte miRNA in den Kontext zu ihren potentiellen Ziel-mRNAs zu setzen und dadurch eine funktionale Regulation der Translation zu identifizieren.

2 *Material und Methoden*

2.1 Geräte

Im Verlauf der Arbeit wurden folgende, in Tabelle 2.1 aufgeführten Geräte eingesetzt. Alle Geräte entsprachen dem üblichen Laborstandard.

Tabelle 2.1: Alphabetische Liste der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Gerätebezeichnung	Bezugsquelle
Brutschrank:	
IG 150	Jouan
Durchflusszytometer:	
Coulter Epics Elite ESP Flow Cytometer	Beckman Coulter
Software Expo32	Beckman Coulter
FACScan	BD Becton Dickinson
FACSCalibur BD	BD Becton Dickinson
Software für FACS-Analyse PC Lysis	Win MDI, Cellquest
Elektroblotkammer	Biometra
Gelelektrophoresezubehör:	
Flachbettkammern für Agarosegele	PeqLab Biotechniques
Glasplatten und Zubehör	Biometra
PowerPak 300	Biorad
Inkubationsschüttler:	
Schüttelapparate 3005-3020 Modell G25	Gesellschaft für Labortechnik
Mikroskope:	
Inversemikroskop	Hund
Photodokumentationsanlage:	
P91 Herolab	Mitsubishi
Photometer:	
Nanodrop [®] N-1000 Spectrometer	PeqLab Biotechniques
Quant Pro	Amersham Pharmacia Biotech

Pipettierhilfe Pipettus	IntegraBioscience
Sequenziergerät:	
96 Kapillarsequenzierer ABI3700	Applied Biosystems
Speed-Vac-Zentrifuge	Bachofer
Sterilbank:	
Laminarflow HeraSafe	Heraeus
Thermocycler:	
GeneAmpPCR System 9700	Applied Biosystems
GeneAmpPCR System 2700	Applied Biosystems
Thermocycler für Real-Time PCR:	
ABI PRISM™ Sequence Detector 7700	Applied Biosystems
ABI PRISM™ Sequence Detector 7900HT	Applied Biosystems
Thermomixer	Eppendorf
Trockenschrank	Heraeus
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
Vortexer	IKA Labortechnik, BRD
Wasserbad	GFL 1083
Zentrifugen:	
Rotina 46R	Hettich
Megafuge 1.0R	Heraeus
Mikro20	Hettich

2.2 Chemikalien

Im folgenden sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und die Bezugsquellen aufgelistet.

Tabelle 2.2: Alphabetische Liste der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Bezugsquelle
Agarose	Invitrogen
Ammoniumchlorid-Lösung	lokale Produktion der HHU
Ampicillin	Sigma
Aqua injectabilia	Braun
β -Mercaptoethanol	Sigma
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Sigma
Chloroform	Sigma
Desoxyribonukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	PeqLab Biotechniques
DMSO	Sigma
Ethanol p.a.	Roth
Ethanol vergällt	lokale Produktion der HHU
EDTA	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll (Biocoll Separation Solution)	Biochrom
3-Glycidoxypropyl-trimethoxysilan (GPS)	Aldrich
Glycerin	Roth
Isopropanol	Roth
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Licrosolv (HPLC-Grade)	Merck
Molekulargewichtsmarker:	
1kb DNA-Leiter	PeqLab Biotechniques
100 bp Leiter	PeqLab Biotechniques
10 bp-Leiter	Invitrogen
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydroxid	Roth
γ -P ³²	Hartmann Analytics

PBS (Phosphate buffered saline)	Serag Wiessner
Phenol	Sigma
Tris-Base	Roth
Trypanblau Lösung (0,4%)	Gibco
Sephadex G50	Amersham
Xylencyanol	Sigma

2.3 Verbrauchsmaterialien

Im folgenden sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien und ihre Bezugsquellen aufgelistet.

Tabelle 2.3: Alphabetische Liste der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Material	Bezugsquelle
Glasobjektträger	Engelbrecht
Plastikware:	
0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
96-Loch-Platten	Corning
Plastikware für PCR:	
0,2 PCR-Reaktionsgefäße	Robbins Scientific
384-Loch Real-Time PCR-Platten	Applied Biosystems
Klebefolie zum Versiegeln der Platten	Applied Biosystems
96-Loch Real-Time PCR-Platten	Abgene
Ultra Clean Cap Strips (opt. Platten)	Abgene
Stabpipetten	Corning-Costar
Zellisolutionsmaterial:	
MACS TM -Säulen	Miltenyi Biotec
Zellsiebe (40 µm Nylon)	Becton Dickinson
Spritzenfilter Minisart (0,2 µm/0,4 µm)	Satorius
Zellkulturgefäße:	
15 ml, 50 ml Röhrchen Falcon	Becton Dickinson
96-Well Rundbodenplatten	Cellstar Greiner
24-Well Zellkulturplatten	Corning
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 175 cm ²)	Nunc

75 cm ² Zellkulturflaschen	Greiner
5 ml Polypropylen-Röhrchen	Becton Dickinson
Kryoröhrchen	Greiner

2.4 Puffer und Medien

2.4.1 Materialien für Zellkultur

Tabelle 2.4: Liste der verwendeten Zellkultur-Materialien.

Material	Bezugsquelle
DMEM	Gibco
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom
Humanes Serumalbumin (HSA)	Octapharma
Interleukin-2 (rekombinates IL-2, Proleukin)	Chiron
Interleukin-10	TeBu
Interleukin-15	TeBu
Rinderserumalbumin (BSA, Fraktion V)	Sigma
RPMI 1640	Lonza
TGF- β	PreproTech

2.4.2 Puffer für Molekularbiologie

<u>TE-Puffer</u>			<u>Blaumarker</u>		
10	mM	Tris-HCl (pH 7,4)	35	ml	Aqua dest.
1	mM	EDTA (pH 8,0)	15	ml	Glycerin
			1	Spatelspitze	Brom-phenolblau
			1	Spatelspitze	Xylencyanol

2.5 Antikörper

Tabelle 2.5: Liste der verwendeten humanen Antikörper.

Antikörper:	Konjugat:	Bezugsquelle
Anti-CD3	FITC	Beckman Coulter
Anti-CD3	PE-Cy5	Beckman Coulter
Anti-CD4	PE	Beckman Coulter
Anti-CD8	FITC	Beckman Coulter
Anti-CD14	FITC	Beckman Coulter
Anti-CD15	PE	MiltenyiBiotech
Anti-CD16	FITC	Beckman Coulter
Anti-CD19	PE	Beckman Coulter
Anti-CD34	PE-Cy5	Beckman Coulter
Anti-CD38	PE	Beckman Coulter
Anti-CD56	PE	Beckman Coulter
Anti-CD56	PE	MiltenyiBiotech
Anti-CD56	PE-Cy5	Pharmingen
Anti-CD94	PE	Pharmingen
Anti-NKAT2	FITC	Pharmingen
Anti-NKAT2	PE	Pharmingen
Anti-NKB1	FITC	Pharmingen
Anti-NKB1	PE	Pharmingen
Anti-KIR2DS4	PE	Pharmingen
Anti-Lin 1	FITC	BD
Isotyp-Kontrolle	FITC/PE	Beckman Coulter

2.6 Biologisches Material

2.6.1 Humane Zelllinien

Tabelle 2.6: Liste der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien.

Zelllinie	Herkunft	Referenz
NK3.3	IL-2 abhängige NK-Zelllinie	(Kornbluth et al., 1985)
NKL	IL-2 abhängige NK-Zelllinie	(Robertson MJ, 1996)
HeLa	Humanes Zervixcarzinom	(Scherer WF, 1953)
Jurkat	CD4 ⁺ CD3 ⁺ T-Zelllinie	(Gillis S, 1980)

2.6.2 Blutproben

Die Isolation der primären hämatopoietischen Zellpopulationen erfolgte aus frischem, peripheren Blut gesunder Spender der Arbeitsgruppe PD Dr. Uhrberg, ITZ, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf. Blutzellkonzentrate wurden freundlicherweise von PD Dr. Tonn, Blutspendezentrale DRK Hessen, Frankfurt zur Verfügung gestellt. Nabelschnurblutproben (Cord Blood, CB) wurden von Prof. Dr. Kögler zur Verfügung gestellt.

2.7 Molekularbiologische Reagenzien

2.7.1 Oligonukleotide für Northern Blot

Tabelle 2.7: Liste der Oligonukleotide zum Nachweis von miRNAs mittels Northern Blot.

Name	Sequenz	Firma
miR-142-3p	tccataaagtaggaaacactaca	ThermoScientific
miR-148a	acaaagttctgtagtgcaactga	ThermoScientific
miR-124a	ttaaggcaccggtgaatgcca	ThermoScientific
miR-16	tagcagcacgtaaatattggcg	ThermoScientific
miR-181a	aacattcaacgctgctcggtagt	ThermoScientific

2.8 Verwendete Software

Microsoft Word 2000 und Excel 2000

CellQuest

Treeview (freundlicherweise von Dr. Polen zur Verfügung gestellt)

SDS Sequenz Detection System 2.2

2.9 Internet

Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/html
TF-Search	http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html
Sequenzvergleiche	http://www.genecards.org/index.shtml
MiRNA:	http://microna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml http://www.microna.org/ http://pictar.bio.nyu.edu/ http://www.targetscan.org/ http://www.diana.pcbi.upenn.edu/miRGen.html

2.10 Methoden

2.10.1 Allgemeine Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Luftfeuchte kultiviert

2.10.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl und Viabilität werden die Zellen mit Trypanblau gefärbt. Diese Färbelösung kann nur durch die Zellmembran toter Zellen eindringen und färbt das Zytoplasma blau. Lebende Zellen bleiben durchsichtig weiß und lassen sich so von den angefärbten toten Zellen unterscheiden.

Zur Ermittlung der Zellzahl werden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanlösung gemischt und in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Die Zellzahl pro ml ergibt sich aus folgender Formel:

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{Gezählte Zellen}}{\text{Anzahl der gezählten Kästchen} * \text{Verdünnungsfaktor} * 1 \times 10^4}$$

2.10.3 Kultivierung von Zellen

2.10.3.1 Adhärenente Zellen

Die Kultivierung adhärenente HeLa-Zellen erfolgte in Gewebekulturflaschen unter Verwendung von DMEM-Medium inklusive 10% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂. Das Splitten der Zellen (Verdünnen) wurde durchgeführt, sobald die Zellen eine konfluente Zellschicht (Layer) bildeten, da sie nicht kontaktinhibiert sind, sondern sich gegenseitig überwachsen würden. Dazu erfolgte eine enzymatische Loslösung der Zellen vom Flaschenboden. Zunächst wurde das Kultivierungsmedium abgenommen und die Zellschicht mit PBS gewaschen. Anschliessend erfolgt die Inkubation mit 1 ml Trypsin für 5 bis 10 min bei 37°C im Brutschrank. Haben die Zellen ihre Adhärenenz verloren, werden sie in serumhaltigen Medium aufgenommen, um die Wirkung des Trypsins zu blockieren und in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:5 in der alten oder in einer neuen Flasche verdünnt ausgesät.

HeLa-Medium

		DMEM
10	%	FCS
1	%	Penicillin/Streptomycin

2.10.3.2 Suspensionszellen

Suspensionszellen wurden je nach ihrer Verdopplungszeit alle 2 bis 3 Tage mit Medium verdünnt. Dazu wird entweder ein Teil der Zellen verworfen und mit frischem Medium aufgefüllt oder das Volumen durch Zugabe von frischem Medium erhöht. Die Konzentration von Suspensionszellen sollte je nach Zelllinie zwischen 1×10^5 und $0,5 \times 10^6$ Zellen pro ml liegen, bei frischen NK-Zellen wurden 1×10^6 Zellen pro ml ausgesät.

NK-Zellmedium

		RPMI 1640
10	%	FCS
5	%	humanes Serumalbumin
1	%	Penicillin/Streptomycin
		100-1000 U/ml IL-2

NK3.3-Medium

		RPMI 1640
10	%	FCS
1	%	Penicillin/Streptomycin
10	%	IL-2 haltiger Kulturüberstand nach (Kahle, 1981, abhängig vom Reaktionsansatz)

Jurkat

		RPMI 1640
10	%	FCS
1	%	Penicillin/Streptomycin

2.10.3.3 Einfrieren von Zellen

Pro 1×10^7 Zellen wird unter sterilen Bedingungen 1 ml kaltes Einfriermedium zugegeben. Die Zellen werden in Kryotubes gefüllt. Diese werden in Einfrierboxen über Nacht in die -80°C -Truhe gegeben. Die mit Isopropanol gefüllten Boxen ermöglichen ein schonendes Einfrieren um 1°C pro Minute. Am nächsten Tag werden die Kryotubes in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt und können so Langzeit gelagert werden.

Einfriermedium

		RPMI 1640
50	%	FCS
1	%	Penicillin/Streptomycin
10	%	DMSO

2.10.3.4 Auftauen von Zellen

Das im Einfriermedium enthaltene DMSO verhindert im Verlauf des Einfriervorgangs durch Kristallbildung bedingte Zellschäden, kann jedoch bei Raumtemperatur zur Lyse der Zellen führen. Deshalb muss der Auftauvorgang sehr schnell erfolgen und das DMSO möglichst schnell verdünnt werden. Das Auftauen erfolgte durch eine rasche Überführung der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen in ein 37°C warmes Wasserbad. Sobald nur noch kleine Eisbröckchen übrig waren, wurde der Inhalt des Kryoröhrchens in 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt und die Zellen bei 1500 rpm für 7 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in einem angemessenen Volumen Kulturmedium aufgenommen, so dass die Zellzahl bestimmt werden konnte (Kap. 2.10.2)

2.10.3.5 Isolation von mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die Isolation mononukleärer Zellen (*mononuclear cells*, MNC) erfolgte in Abhängigkeit des Versuchsansatzes aus frisch abgenommenem Blut erwachsener Spender oder aus sogenannten *Buffy Coats*, einem Zellkonzentrat, dem das Serum entzogen worden ist.

Die Blutproben wurden mit einem Volumen PBS verdünnt und auf Ficoll-Hypaque-Trennlösung (= Ficoll), welche eine Dichte von 1,077 besaß, geschichtet. Dabei wurde 15 ml Ficoll-Lösung mit maximal 20 ml verdünntem Blut beschickt. Die Separation der Leukozyten von den restlichen Blutzellen erfolgte mittels Zentrifugation (35 min, RT, 1000 x g, ohne Bremse). Die MNCs sind im sogenannten Interphasering lokalisiert, während Thrombozyten im Serumüberstand angereichert sind. Erythrozyten und ein Großteil der Granulozyten befinden sich im Anschluss an die Zentrifugation im Pellet. Die angereicherte MNC-Fraktion wurde anschließend zweimal mit PBS/EDTA gewaschen und das Zellpellet abschliessend in PBS/EDTA resuspendiert.

2.10.3.6 Erythrozytenlyse durch Ammoniumchlorid

Je nach Frische der Blutkonserven verblieben Erythrozyten in der Interphase des Ficoll-Gradienten. Diese konnten mit Ammoniumchlorid lysiert werden. Dazu wurde die Zellsuspension aus Kapitel 2.10.3.5 mit Ammoniumchlorid-Lösung verdünnt und 7 min bei RT inkubiert. Die intakten Zellen wurden danach pelletiert (Zentrifugation für 7 min, RT, 1700 rpm). Ein erneuter Waschschriff mit PBS/EDTA entfernte verbliebene Zelltrümmer.

2.10.3.7 Zellisolation unter Verwendung paramagnetischer Microbeads (MACS™)

Das Prinzip der magnetbasierenden Zellisolation (magnet activated cell sorting, MACS™) beruht auf der Markierung der Zellen mit Antikörpern, an die paramagnetische Partikel (Microbeads) gekoppelt sind. Trägt man die so markierten Zellen auf eine Säule auf, deren Matrix durch einen Magneten magnetisiert worden ist, so binden die mit einem Microbead markierten Zellen an dieses Säulenmaterial, während nicht markiert Zellen nicht zurückgehalten werden können und die Säule passieren. Entfernt man die Säule aus dem Magneten, können markierte Zellen eluiert werden.

Die Anreicherung gewünschter Zellpopulationen kann mit zwei verschiedenen Strategien erfolgen. Bei der positiven Selektion wird nur die gewünschte Zellpopulation markiert und die Zellpopulation durch direkte Markierung angereichert.

Die negative Selektion (Depletion) ermöglicht eine Isolation der gewünschten Zellpopulation ohne Markierung der Zielzellen; die ungewünschten Zelltypen werden markiert und dadurch depletiert.

Die erste Methode wurde zur Anreicherung der hämatopoietischen, CD34⁺ Stammzellpopulationen sowie zur Isolation von NK-Zellen für die miRNA-Expressionsanalyse angewandt.

Die zweite Methode ermöglichte die Anreicherung von CD56⁺ NK-Zellen zur Durchflusszytometrischen Sortierung der NK-Subpopulationen.

2.10.3.8 Isolation von Granulozyten

Die Abnahme der Blutprobe für die Isolation von Granulozyten erfolgte in einem Citrat-Röhrchen. Anschließend wurde die Blutproben mit Ammoniumchlorid-Lösung aufgefüllt, 15 min bei RT inkubiert und dadurch eine Erythrozytenlyse im Vollblut durchgeführt. Die Lyse wurde durch Zugabe des Waschpuffers (PBS/Citrat) abgestoppt und die Granulozyten sowie die Leukozyten mittels Zentrifugation pelletiert (7 min, 1700 rpm, RT). Zur Isolation der Granulozyten aus diesem Zellgemisch wurden CD15-Microbeads (Miltenyi Biotech) hinzugefügt. Die Bindung des Antikörpers an CD15 auf der Oberfläche der Granulozyten erfolgte für 15 min bei 4°C. Nicht gebundene Antikörper wurden in einem Waschschrift entfernt und das resultierende Zellpellet in PBS aufgenommen. Die Anreicherung der Granulozyten erfolgte unter Verwendung der MACS-Technologie (siehe Kap. 2.10.3.7)

2.10.3.9 Isolation von Thrombozyten

Die Isolation der kleinen, kernlosen Thrombozyten (Blutplättchen) erfolgte unter Verwendung des von Rox beschriebenen Protokolls mit geringen Modifikationen (Rox et al., 2004). Vollblut gesunder Spender wurde in einem Citratröhrchen abgenommen und 10 min bei RT und 200 x g zentrifugiert (ohne Bremse). Danach waren die von den Erythrozyten getrennten Thrombozyten in der oberen Phase lokalisiert. Von diesem Überstand wurden 2/3 abgenommen und in ein frisches Falcon-Röhrchen überführt, dieses mit PBS aufgefüllt und 10 min bei 1900 rpm zentrifugiert. Die im Pellet enthaltenen Blutplättchen wurden gezählt

und zum Nachweis der Reinheit mit einem Eosin-Methylenblau-Gemisch gefärbt (May-Grünwald-Färbung, siehe Kap. 2.10.3.10).

2.10.3.10 May-Grünwald-Färbung

Die Erstellung eines Differentialblutbildes durch das Anfärben der zellulären Strukturen beruht auf Arbeiten der beiden Wissenschaftler Romanovsky (1891) und Paul Ehrlich (1910). Die Blutzellen lassen sich je nach Plasma und Kernmorphologie unterschiedlich anfärben und können so voneinander unterschieden werden. Die May-Grünwald-Färbung beruht auf einer pH-abhängigen Farbgebung und ist so besonders für Granula geeignet.

Die verschiedenen Arten der Granulozyten speichern unterschiedliche Substanzen und werden aufgrund des Färbeverhaltens ihrer Granula unterklassifiziert. Eosinophile Granulozyten binden saure Farbstoffe (Eosin) und erscheinen rot, während basophile Granulozyten basische Farbstoffe binden (Methylblau) und tiefblau bis violett im lichtmikroskopischen Bild erscheinen. Neutrophile Granulozyten binden keinen der beiden Farbstoffe, besitzen jedoch sehr viele Lysosomen, welche rotviolett angefärbt werden. Bei den Erythrozyten und Thrombozyten wird das Zytoplasma hellrot bzw. leicht bläulich angefärbt.

Der Nachweis der Zelltypen erfolgte auf einem luftgetrocknetem Ausstrich. Dafür wird die Zellsuspension auf einen Objektträger ausgestrichen und 30 min bei RT getrocknet. Auf diesem wird die May-Grünwald-Färbelösung aufgetragen und für 5 min bei RT inkubiert. Anschliessend den Objektträger mit PBS gut spülen und trocknen lassen. Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop.

2.10.3.11 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit sowohl zur Oberflächentypisierung von Zellen als auch zur Durchfluss-zytometrischen Zellsortierung (= Sorten) eingesetzt. Dafür wurden Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen ein spezifisches Oberflächenantigen markiert. Diese Antikörper sind mit Fluoreszenzfarbstoffen wie Fluorescein-Isothiocyanat (FITC, grün), Phycoerythrin (PE, rot) oder dem Tandemkonjugat aus Phycoerythrin und Cyanin-5 (PE-CY5, dunkelrot) konjugiert. Für die Analyse werden die Zellen in eine Messküvette gesaugt, so dass ein Strom aus einzelnen Zellen entsteht. Die Zellen in dieser sogenannten hydrodynamischen Fokussierung werden von einem Argon-Laser (455 nm)

erfasst und dabei wird der Farbstoff an den Antikörpern angeregt. Photodetektoren messen die Lichtstreuung, die einen Rückschluss auf die Größe der Zellen (Forward Scatter, FSC) sowie deren Granularität (Side Scatter, SSC) erlaubt. Die Emissionsmessung der angeregten Fluoreszenzfarbstoffe der Antikörper ermöglicht eine Aussage über die Expression, d.h. Dichte und Verteilung der verschiedenen Oberflächenantigene.

Um zwischen positiven und negativen Zellen zu unterscheiden, werden die Zellen zur Kontrolle mit einem unspezifischen Antikörper des gleichen Isotyps markiert, der kein bekanntes Oberflächen-Antigen erkennt (Isotypenkontrolle).

Die Messung der Oberflächenantigene erfolgte an einem Durchfluss-Zytometer FACScalibur™ der Firma Becton Dickinson. Die Durchflusszytometrische Zellsortierung wurde an einem Coulter Epics Elite ESP Flow Cytometer der Firma Beckman Coulter durchgeführt.

2.10.3.12 Färben der Zellen für die Durchflusszytometrie

Das Färben der Zellen für durchflusszytometrische Analysen erfolgte nach den Herstellerangaben. Isolierte Zellen wurden zentrifugiert und in 100 µl PBS aufgenommen. Die für die Färbung benötigte Kombination der Antikörper wurde zu dieser Zellsuspension hinzugefügt. Die Kopplung der Antikörper an die zelleigenen Antigene erfolgte im Dunkel bei 4°C (Kühlschrank), um das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe sowie das Internalisieren der Antikörper zu verhindern. Im Anschluss an eine 30 minütige Inkubation wurden nicht gebundene Antikörper in einem Waschschrift entfernt, die Zellen in 500 µl PBS resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung kühl gelagert.

2.10.3.13 Zytokin-Stimulation von primären NK-Zellen

Für die Stimulation von primären NK-Zellen mit Zytokinen wurden frisch mittels MACS-Technologie (Kap. 2.10.3.7) oder Durchflusszytometrie (Kap. 2.10.3.11) isolierte Zellen in Kulturmedium aufgenommen und unter Zugabe der jeweiligen Zytokinmischung in Abhängigkeit des Versuchsabsatzes einen Tag (Kurzzeitkultur) oder zwei Wochen (Langzeitkultur) kultiviert.

Stimulationsmedium frischer NK-Zellen

		RPMI 1640	
10	%	FCS	
5	%	humanes Serumalbumin	
1	%	Penicillin/Streptomycin	
100-1000	U/ml	IL-2	und in Abhängigkeit vom Reaktionsansatz
10	ng/ml	IL-10	oder
10	ng/ml	IL-15	oder
10	ng/ml	TGF- β	oder

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 RNA-Isolation**2.11.1.1 Isolation von Gesamt-RNA**

Die Isolation von Gesamt-RNA (umfasst alle RNA-Moleküle grösser 200 Nukleotide) wurde unter Verwendung des RNeasy Kits und der QiaShredder-Säulen (beides Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Durch einen zusätzlichen DNase-Schritt wurden kontaminierende DNA-Reste abgebaut. Das Zellpellet wurde mittels β -Mercaptoethanolhaltigem Lysepuffer lysiert und auf die QiaShredder-Säule aufgebracht. Diese ermöglichte einen besseren Zellaufschluss. Der im Anschluss an eine Zentrifugation aufgefangene Durchfluss wurde mit 70% Ethanol p.A. versetzt, gut gemischt und auf eine RNeasy-Säule transferiert. Durch einen Zentrifugationsschritt (1 min, 13000 rpm, RT) können die RNA-Moleküle an der Säule binden. Wiederholtes Waschen und der DNase-Schritt eliminiert verbliebene Protein- bzw. DNA-Reste. Die abschliessende Elution der angereicherten RNA erfolgte mit RNase-freiem Wasser. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte wie unter Kap. 2.11.2 beschrieben.

2.11.1.2 Isolation von microRNA

Die Isolation von microRNA (miRNA) aus Zellmaterial erfolgte unter Verwendung des *mirVana* miRNA Isolation Kit (Ambion; Applied Biosystems). Die Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellerprotokolls. In Kürze zusammengefasst wurden folgende Schritte durchgeführt.

Die pelletierten Zellen wurden in Lysepuffer resuspendiert und das Lysat in Abhängigkeit vom experimentellen Verlauf direkt aufgearbeitet oder aber bei -20°C zur Lagerung weggefroren. Zur Aufarbeitung wurde dem Lysat 1/10 Volumen des miRNA Homogenate-Puffers hinzugefügt und die Probe auf Eis für 10 min inkubiert. Für die folgende organische Extraktion wurde 1 Volumen saures Phenol:Chloroform hinzugegeben und der Ansatz 1 min durch Vortexen gut gemischt. Die Phenol-Fällung erfolgte durch einen Zentrifugationsschritt (5 min, 10000 x g). Danach wurde die obere, wässrige Phase, welche die RNA enthielt, abgenommen und in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Isolation der sogenannten kleinen RNA-Fraktion (*small RNA Fraction*, welche die miRNAs beinhaltet), wurde der wässrigen Phase 1/3 Volumen 100% Ethanol hinzugefügt und diese Mischung auf eine Glasfaser-Säule aufgetragen. Die Trennung der *small RNA Fraction* von den restlichen RNAs erfolgte mittels Zentrifugation (1 min, 10000 x g), bei der die RNA-Moleküle größer 200 Nukleotide (nt) durch die geringe Ethanolkonzentration an der Säule gebunden werden konnten, während RNA-Moleküle, die kleiner als 200 nt waren, nicht immobilisiert werden konnten und im Durchfluss aufgefangen wurden. Der Durchfluss wurde aufgefangen, mit 2/3 Volumen 100% Ethanol versetzt, dieses Gemisch auf eine frische Glasfaser-Säule aufgetragen und zentrifugiert (s.o.). Im Anschluss erfolgten zwei Waschschrte und die abschließende Elution der *small RNA Fraction* sowie der RNA-Moleküle mit einer Länge von mehr als 200 nt von den beiden Säulen. Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Photometer (Kap. 2.11.2).

Die Kontrolle der Integrität der isolierten RNA-Fractionen erfolgte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Silber-Färbung (siehe Kapitel 2.11.8.2 und 2.11.12).

2.11.2 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der aufgereinigten RNA-Proben wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$. Störende Kontaminationen konnten durch den Quotienten der

Extinktion bei 260 nm zur Extinktion bei 280 nm bestimmt werden. Dieses Verhältnis sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen.

2.11.3 Reverse Transkription

Die RNA in einer Zelle besitzt nur eine sehr begrenzte Halbwertszeit und liegt nur in geringer Ausgangskonzentration vor. Bei der Reversen Transkription (RT) werden sogenannten Reverse Transkriptasen (RNA-abhängige DNA-Polymerasen) verwendet, die die Umschreibung von RNA in DNA katalysieren (Baltimore, 1970; Temin HM, 1970). Durch das Ablesen der messengerRNA (mRNA) wird cDNA (*complementary DNA*) synthetisiert. Diese Synthese erfolgte für alle RT-Reaktionen ausser bei der miRNA-Analyse (Kap. 2.11.7) unter Verwendung einer Reversen Transkriptase des MML-Virus (*moloney-murine-leukemia-virus*) und Oligo-dT-Primern, welche an den PolyA-Schwanz der mRNA binden. Die Zugabe von Dithiothreitol (DTT) führte zu einer Stabilisierung der RNA, während RNasin mögliche RNasen inhibieren sollte.

Reaktionsansatz

1-2	µg	RNA
1	µg	Oligo-dT-Primer
10	mM	dNTPs

Inkubation für 5 min bei 65°C, um vorhandene Sekundärstrukturen aufzulösen und eine effektive Bindung des Oligo-dT-Primers an die mRNA zu ermöglichen. Auf Eis erfolgte die Zugabe des Reaktionsmixes.

Reaktionsmix

1	x	Erststrangpuffer
0,1	mM	DTT
40	U	RNasin
400	U	Reverse Transkriptase
A. dest. ad 50 µl		

Die Reverse Transkription erfolgte bei 42°C für 1 h in einem Thermocycler. Durch einen abschliessenden Inkubationsschritt (72°C, 7 min) wurden das Enzym inaktiviert. Die erlangte cDNA wurde sofort weiterverwendet (Kap. 2.11.4 und 2.11.5).

2.11.4 Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR, (Mullis K et al., 1986; Saiki RK et al., 1985) erfolgte unter der Verwendung der HotStar-Taq (Qiagen). Es wurden neben der DNA-Matrize die beiden Startermoleküle (*Forward Primer* und *Reverse Primer*), je 10 µM Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sowie steriles Aqua dest. zugesetzt. Die Amplifikation umfasste 35 Zyklen.

2.11.5 Real-Time PCR

Die Technik der Real-Time PCR stellt eine Kombination der Polymerase-Kettenreaktion mit der Möglichkeit, das dabei entstehende Amplikon im Moment der Synthese (*real-time*, Echtzeit) durch Fluoreszenzfarbstoffe zu beobachten, dar. Dabei ist der Anstieg der Fluoreszenz proportional zur Zunahme des Amplifikationsproduktes. Es bestehen zwei Möglichkeiten, die Zunahme des zu untersuchenden Transkriptes zu bestimmen. Entweder man verwendet zu Quantifizierung interkalierende Farbstoffe wie SYBR GreenTM oder spezifisch-bindende Sonden.

Der Farbstoff SYBR GreenTM lagert sich in doppelsträngige DNA ein (interkalieren), wodurch die Fluoreszenz ansteigt. Mit einer Zunahme der Ziel-DNA korreliert somit eine Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Bei dieser Methode kann jedoch nicht zwischen den PCR-Produkten unterschieden werden, so dass die Amplifikation von spezifischem Produkt und Artefakten möglich ist. Deshalb muss im Anschluss an die Real-Time PCR unter Verwendung von SYBR GreenTM eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt werden, durch die die Fragmentlänge und -anzahl und folglich die Spezifität bestimmt wird. Um weitere Unsicherheiten zu vermeiden, wurden die PCR-Endprodukte abschliessend gelelektrophoretisch analysiert (Kap. 2.11.8.1). Ein weiterer Nachteil der SYBR GreenTM Real-Time PCR ist, dass keine Multiplex-Messungen (Detektion mehrerer verschiedener Ziel-DNAs in einer Reaktion) durchgeführt werden können.

SYBR-Green-Reaktionsansatz

1	µl	cDNA
1	µl	forward primer
1	µl	reverse primer
12,5	µl	SYBR-Green I
9,5	µl	Merck-Wasser

Das PCR-Protokoll wurde in Abhängigkeit des zu untersuchenden DNA-Templates gewählt.

Die zweite Methode der Quantifizierung des PCR-Produktes im Verlauf der Real-Time PCR besteht durch die Ausnutzung des *Förster resonance energy transfers* (FRET). Dabei gibt ein Donor-Fluorochrom (Reporter) durch die Anregung mittels Lichtquelle einen Teil seiner Energie an ein in der Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom (Quencher) ab. Nimmt der Abstand zwischen Donor und Akzeptor ab, so nimmt FRET und dadurch das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab, während das des Donors zunimmt.

Bei der Verwendung von TaqMan-SondeTM wird diese Chemie angewandt. Die spezifisch an die Ziel-DNA bindende Sonde besitzt an ihrem einen Ende einen Quencher und ist an dem anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (FAM oder TAMRA) markiert. Bei einer intakten TaqMan-SondeTM wird durch den Quencher die Energieübertragung unterdrückt. Hybridisiert die Sonde während des PCR-Zyklus an den komplementären DNA-Strang, so wird die Sonde aufgrund einer zusätzliche Exonuklease-Aktivität der verwendeten Taq-Polymerase abgebaut. Dadurch entfernen sich Quencher und Fluorophor voneinander und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden. Reaktionsansatz siehe Kap. 2.11.7.

2.11.6 Auswertung von Real-Time PCR-Ergebnissen

Die Auswertung der Real-Time PCR erfolgt mittels des sogenannten Amplifikationsplots. Dieser beinhaltet die Auftragung der Fluoreszenz nach Zyklenzahl. Dafür wurde neben der Fluoreszenz-gekoppelten Sonde eine Fluoreszenz-gekoppelte Passivkontrolle mitgeführt, um deren Fluoreszenzsignal die Reporter-Farbstoffsignal korrigiert wird. Diese Normalisierung ist nötig, um Änderungen in der Konzentration oder im Volumen auszugleichen und resultiert im R_n -Wert (*normalized reporter*).

Die Real-Time PCR zeichnet sich durch drei Phasen ab. In der ersten Phase der Amplifikation ist die Templatemenge (Ausgangsmaterial) begrenzt und der Wahrscheinlichkeit, dass sich die einzelnen Komponenten des Reaktionsmixes treffen suboptimal. In dieser Phase liegt die Basislinie (*baseline*), die das Hintergrundrauschen darstellt, was von der eigentlichen Produktfluoreszenz automatisch abgezogen wird (ΔR_n ; R_n -Wert minus *baseline*). In der dritten Phase steigt die Menge an Produkt derart an, dass die Substrate langsam verbraucht und die Enzyme durch die Hitze zerstört sind, so dass eine Plateauphase erreicht wird. Der exponentielle und damit quantitative Anstieg der Produktmenge findet somit nur in der mittleren Phase statt.

Für die Errechnung der Probenkonzentration wird der Ct-Wert (*threshold of cycle*, Schwellenwert) verwendet. Dies ist der PRC-Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt.

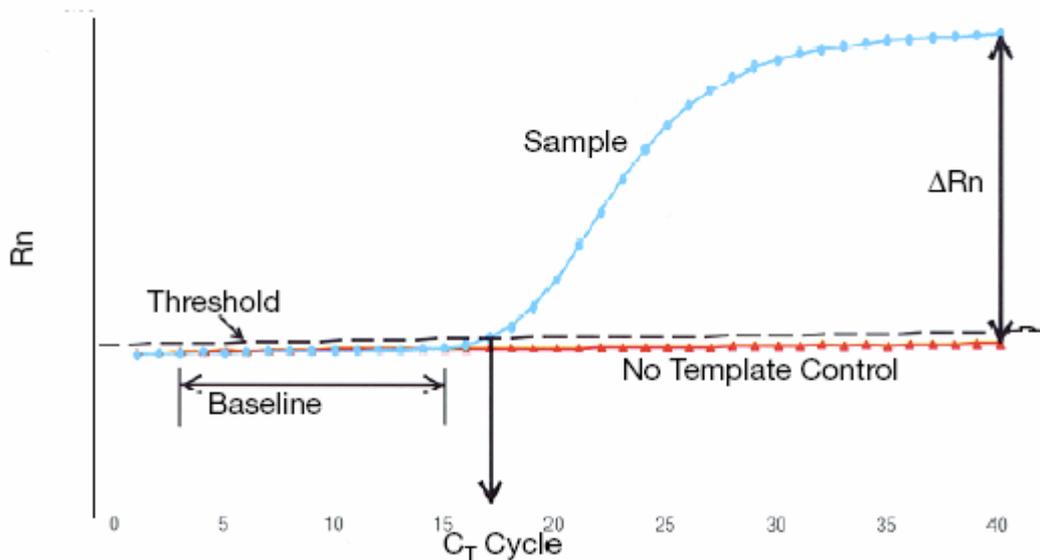


Abb. 2.1: Amplifikationsplot einer Real-Time PCR unter Verwendung einer Probe.

Dargestellt ist der exponentielle Anstieg der Fluoreszenz, die für die Probe (*sample*) gemessen wurde, unter Verwendung der Zyklusanzahl auf der x-Achse und der normalisierten Reporterfluoreszenz (R_n) auf der y-Achse. Der Zyklus, an dem die Fluoreszenz das Hintergrundrauschen (*baseline*) übertrifft, wird C_T -Cycle genannt (dem Real-Time PCR-Handbuch von Applied Biosystems entnommen).

Der Vergleich von zwei Proben erfolgt anhand ihres Ct-Wertes; d.h. eine Probe mit einem geringeren Ct-Wert liegt in höherer Konzentration vor als eine Probe mit höherem Ct-Wert. Die Berechnung der Ausgangsmenge erfolgte unter Verwendung der SDS-Auswertesoftware (*Sequence detection system*, Applied Biosystems). Mit Hilfe der Software wurden die Basislinie und die Ct-Werte bestimmt, die in die weiteren Analysen einfließen.

Um Schwankungen in der eingesetzten Ausgangsmenge auszugleichen, wurden die Ct-Werte der zu untersuchenden Probe zunächst mit dem Ct-Wert eines ubiquitär exprimierten Gens (*housekeeping-Gen*) normalisiert. Die dabei angewandte Formel $C_{t(\text{Gen von Interesse})}$ minus $C_{t(\text{housekeeping-Gen})}$ ergab den normalisierten Ct-Wert (ΔCt). Dieser wurde dann in den Vergleich zweier Proben eingesetzt, wobei die Probe von Interesse um die Referenz normalisiert wurde und den $\Delta \Delta Ct$ -Wert ergab. Mit diesem konnte der differentielle Expressionsunterschied zwischen den Proben ermittelt werden. Wenn man davon ausgeht, dass mit jedem Zyklus das Ausgangsmaterial verdoppelt wird, kann man mit der Formel $2^{-(\Delta \Delta Ct)}$ den relativen Unterschied zur Referenz errechnen.

2.11.7 Quantifizierung von microRNAs unter Verwendung von TaqMan-basierenden PCR-Assays

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten TaqMan-PCR-Assays sind beide von der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA). In den folgenden zwei Kapiteln werden sowohl der 330-miRNA-multiplex-PCR-Assay (330-Multiplex-Assay, Kapitel 2.11.7.1) als auch der TaqMan miRNA human panel early access kit (nachfolgend als „miRNA-Einzel-PCR-Assay“ angeführt, Kapitel 2.11.7.2) beschrieben.

2.11.7.1 MiRNA-Expressionsanalyse unter Verwendung des 330-Multiplex-Assays

Der für die Analyse der hämatopoietischen Zellpopulationen verwendete 330-Multiplex-Assay ist ein kommerziell nicht erhältlicher miRNA-Analyse-Ansatz, der im Rahmen dieser Arbeit getestet und optimiert wurde. Die Anwendung passiert auf der von Chen et al. (Chen et al., 2005) veröffentlichten Methode zur Quantifizierung der miRNA-Expression im Einzelreaktionsansatz. Die hier beschriebene Methode besteht aus einem Gemisch von 330 verschiedenen miRNA-spezifischen Primern und ist in Abb. 2.2 graphisch dargestellt und wird im folgenden kurz beschrieben.

Lyse der Zellen

Der erste Schritt besteht aus der Lyse der Zellen; dafür wurde die dem Versuchsansatz entsprechende Zellzahl in 3 µl PBS aufgenommen und die Zellen durch eine Behandlung der Zellsuspension bei 95°C für 5 min in einem 9700 Thermocycler (Applied Biosystems, USA) mit beheiztem Deckel aufgeschlossen (Abb. 2.2, Schritt 1). Für die Etablierungsversuche wurden Zellverdünnungen von 100000 Zellen bis eine Zelle eingesetzt, während für die Untersuchung der miRNA-Expression in hämatopoietischen Zelltypen immer die gleiche Zellzahl von 5000 frischen Zellen pro Spender benutzt wurde. Im Fall der Analyse humaner embryonaler Stammzellen erhielten wir von Herrn Prof. Brüstle (Bonn) in Lysispuffer aufgenommen und somit denaturierte Zellen, aus denen die *small RNA Fraction* mittels MirVana (Ambion, Kap. 2.11.1.2) isoliert wurde. Für die Analyse der miRNA-Expression der embryonalen Stammzellen wurde ein RNA-Aliquot entsprechend 5000 Zellen in den ersten Schritt eingesetzt.

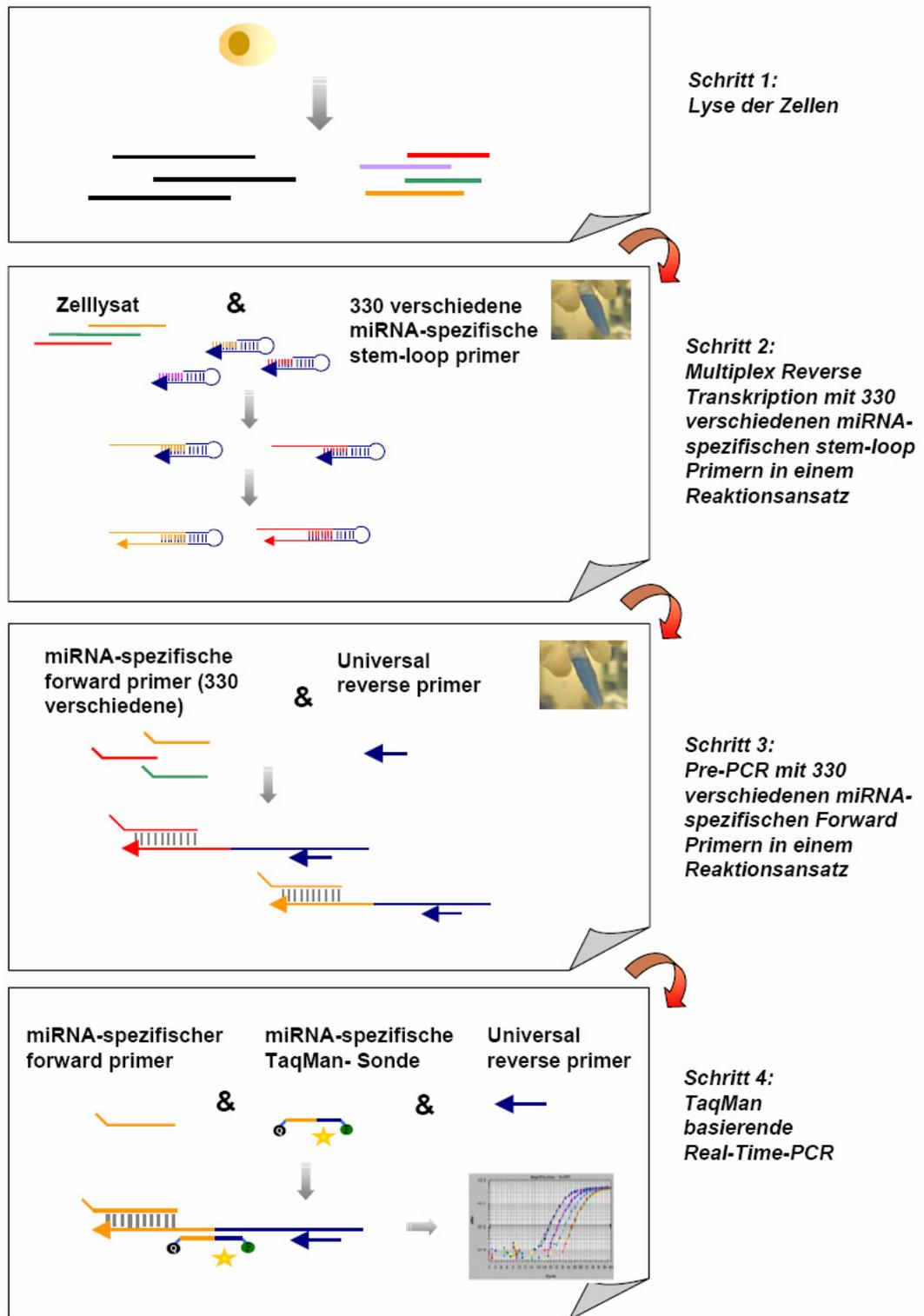


Abb. 2.2: Schema der miRNA-Expressionsanalyse unter Verwendung des 330-Multiplex PCR-Assays.

Reverse Transkription

Zu dem Zelllysats wurde im Anschluss an die Lyse der unten angeführte Reaktionspuffer (330-Multiplex-RT-Reaktionspuffer) für das Umschreiben der miRNA in komplementäre DNA hinzugefügt. Die in Abb. 2.2 unter Schritt 2 dargestellte Reverse Transkription erfolgte unter Zugabe der Reagenzien des „high capacity cDNA archive kit“ (Applied Biosystems) und einer Mischung aus 330 verschiedenen, miRNA-spezifischen *Stem-loop* Primern. Diese *Stem-loop* Primer überlappen an ihrem 5'-Ende mit 8 Nukleotiden des 3'-Endes der miRNA und besitzen an ihrem anderen Ende eine Schlaufenstruktur. Die Reverse Transkription wurde nicht wie üblich bei nur einem Temperaturschritt durchgeführt, sondern erfolgte als sogenannte „pulsed RT-Reaktion“. Dies bedeutet, dass die Temperatur im Verlauf eines Zyklus ansteigt, wie im Temperaturprofil der RT-Reaktion unten dargestellt. Dadurch soll die Spezifität der Reaktion erhöht und unspezifische Interaktionen der Primer für verschiedene miRNAs minimiert werden (Tang et al., 2006).

330-Multiplex-RT-Reaktionspuffer

1	x	cDNA archive buffer
5	mM	dNTPs
2,5	nM	330-plex RP (2,5 nM pro Reverse-Primer)
3,35	U	MMLV
0,26	U	RNase inhibitor
dH ₂ O ad 2 µl Endvolumen		

PCR-Schritt

16°C 30 min / (20°C 30 sec, 42°C 30 sec, 50°C 1 sec) 30 cycles / 85°C 5 min/ 4°C ∞

Pre-PCR

Das resultierende RT-Produkt diente als Template für den anschließenden Pre-PCR-Schritt, der in Abb. 2.2, Schritt 3 schematisch dargestellt ist. Dieser Schritt ist ein Amplifikationsschritt, der bei dieser Multiplex-PCR nötig ist, um auch schwach exprimierte miRNA-Moleküle zu detektieren, die andernfalls unter der Nachweisgrenze liegen würden. Für diesen Schritt wurde der RT-Reaktionsansatz mit Pre-PCR-Reaktionsmix auf ein Endvolumen von 25 µl aufgefüllt und eine 18 Zyklen umfassende PCR (9700 Thermocycler) durchgeführt. Der Reaktionsansatz beinhaltet neben einem universellen Reverse Primer (UR) auch 330 verschiedene miRNA-spezifische forward Primer (FP). Der UR bindet an die Loop-Sequenz des in diesem Schritt linearisierten Stem-loop-Primer (aus Schritt 2). Die FP, welche an das 5'-Ende der jeweiligen miRNA-cDNA aus dem vorangegangenen Schritt binden,

besitzen einen Überhang, der im Verlauf der PCR-Reaktion aufgefüllt wurde. So wurde eine Voramplifikation erzielt.

Pre-PCR-Reaktionspuffer

1	x	TaqMan Universal Master Mix (UMM)
2	mM	dNTPs
1	mM	MgCl ₂
50	nM	330-plex FP
5	μM	UR
0,25	U	AmpliTaqGold
5	μl	RT-template
dH ₂ O ad 25 μl		

PCR-Schritt

95°C 10 min / 55°C 2 min / (95°C 1 sec, 65°C 1 min) 18 cycles / 4°C ∞

TaqMan-basierende Real-Time PCR

Nach Abschluss dieser Schritte wurde das PCR-Produkt 1:4 mit A.dest. verdünnt und in die TaqMan-basierende Real-Time PCR eingesetzt.

Dafür wurden jeweils 2 μl einer Primer-Mischung (bestehend aus einem miRNA-spezifischen Forward Primer und der miRNA-spezifischen TaqMan-Sonde) in ein Loch einer 384-Loch-Platte vorgelegt und Reaktionsmix hinzugefügt. Die PCR wurde nach dem unten angeführten PCR-Protokoll durchgeführt und wie unter Kap. 2.11.6 beschrieben, ausgewertet. Die Real-Time PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung des ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA) durchgeführt. Die Sequenzen der Primer können online abgerufen werden (Tang et al., 2006).

Für die Optimierung des 330-Multiplex-Assays wurden die Real-Time PCR-Reaktionen in Triplikaten durchgeführt. Da sich die Methode als robust erwiesen hat, wurden die relativen miRNA-Expressionsstärken der hämatopoietischen Zelltypen in Einfach-Ansätzen von mindestens drei verschiedenen, gesunden Spendern bestimmt.

Real-Time PCR-Reaktionspuffer

500	nM	Forward Primer
200	nM	TaqMan-Sonde
1	x	UMM
500	nM	UR
0,1	μl	pre-PCR-template
2,85	μl	dH ₂ O

PCR-Schritt

95°C 10 min / (95°C 15 sec, 60°C 1 min) 40 cycles

Die Auswertung der Daten erfolgte wie unter Kap. 2.11.6 beschrieben.

2.11.7.2 TaqMan miRNA human panel early access kit - „miRNA-Einzel-PCR-Assay“

Der miRNA-Einzel-PCR-Assay ist ein miRNA-Analyse-Ansatz der Firma Applied Biosystems, mit dem die Expressionsstärke von 158 verschiedenen miRNA-Genen untersucht werden kann. Dieser Assay passiert auf der von Chen et al. (2005) veröffentlichten Methode zur Quantifizierung der miRNA-Expression im Einzelreaktionsansatz. Die Anwendung dieses Assays erfolgte nach Herstellerangaben, ist aber im Folgenden kurz dargestellt (Abb. 2.3)

Reverse Transkription - miRNA-Einzel-PCR-Assay

Für die Generierung von cDNA wurden in die Reverse Transkription die mittels *mirVana*-miRNA isolierte, angereicherte *small RNA Fraction* eingesetzt (miRVana-Isolation siehe Kap. 2.11.1.2). 1 ng dieser RNA wurde pro Reaktionsansatz mit RT-Reaktionspuffer versetzt und in einem 9700 Thermocycler in cDNA reverse transkribiert (PCR-Zyklus wie unten angeführt).

RT-Reaktionspuffer – Einzel-PCR-Assay

1	x	cDNA archive buffer
0,25	mM	dNTPs
50	nM	Stem-Loop-RT Primer (RP)
3,33	U	MMLV
0,256	U	RNase inhibitor
dH ₂ O ad 7,5 µl Endvolumen		

PCR-Schritt

16°C 30 min / 45°C 30 min/ 85°C 5 min/ 4°C ∞

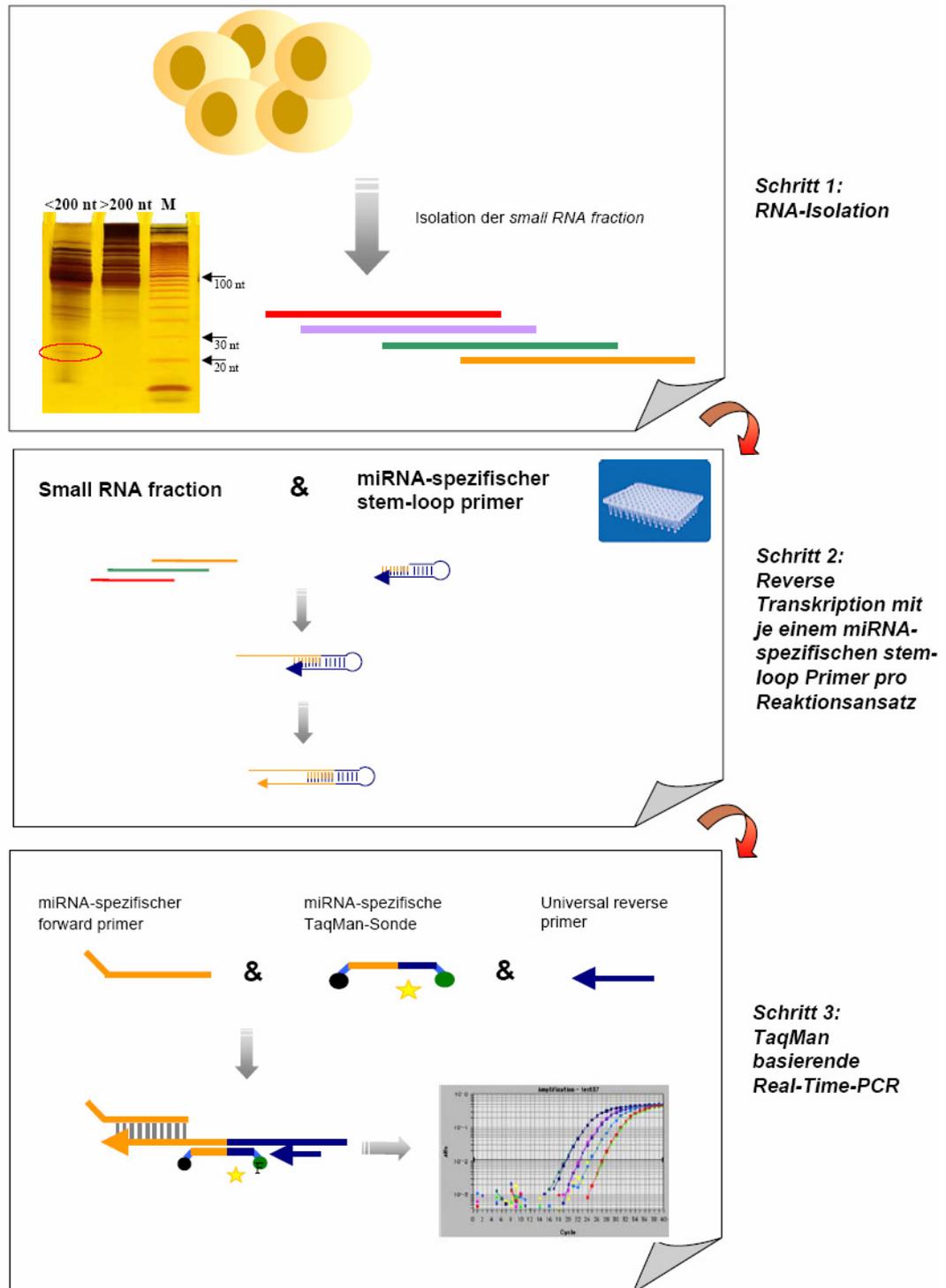


Abb. 2.3: Schema der miRNA-Expressionsanalyse unter Verwendung des miRNA-Einzel-PCR-Assay.

Real-Time PCR - miRNA-Einzel-PCR-Assay

Die Real-Time PCR wurde nach einem Standard-TaqMan-PCR-Protokoll der Firma Applied Biosystems auf einem 7700 Sequence Detection System durchgeführt. Der 10 µl PCR-Ansatz (Abb. 2.3, Schritt 2) beinhaltet neben dem RT-Template auch den TaqMan-Reaktionspuffer.

330-Multiplex-Real-Time-Reaktionspuffer

1	x	TaqMan Universal Master Mix (UMM)
1	x	TaqMan-miRNA-Assay Mix
1/15		RT-Template
dH ₂ O ad 20 µl Endvolumen		

PCR-Schritt

95°C 10 min / (95°C 15 sec, 60°C 1 min) 40 cycles

Die Auswertung erfolgte wie unter Kap. 2.11.6 beschrieben.

2.11.8 Gelelektrophoretische Auftrennungen**2.11.8.1 Trennung von Nukleinsäuren mittels Agarose-Gelelektrophorese**

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer molekularen Masse erfolgte in Agarosegelen unter Verwendung von TBE-Puffer. Entsprechend der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde hierbei eine Agarosekonzentration von 0,6 bis 2% (w/v) gewählt. Die Detektion der DNA im Agarosegel erfolgte mit Hilfe des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid, welcher durch die Bestrahlung mit UV-Licht orangefarben fluoresziert. Bei einer konstanten Stromstärke von 80 mA betrug die Laufzeit bis zur maximalen Auftrennung der DNA-Fragmente etwa 1 Stunde.

Als Standardmarker diente die 1 kb DNA-Leiter von PeqLab Biotechnology.

TBE-Puffer (10x)

107,9	g	Tris-Base
55	g	Borsäure
8,2	g	EDTA
ad	1000 ml	Aqua dest.

2.11.8.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) erlaubt die Auftrennung von kleinen RNA-Molekülen. Das Gel wurde entsprechend des unten angegebenen Puffers gegossen und für 1 h bei RT auspolymerisiert. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel für 2 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gelagert. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei Raumtemperatur und bei 200 V für ca. 1,5 h. Als Größenmarker diente eine 10 bp Leiter (Invitrogen). Das Gel wurde im Anschluss für den Transfer der RNA auf eine Nitrocellulose-Membran (Northern Blot, Kap. 2.11.9) oder für eine Silberfärbung (Kap. 2.11.12) genutzt.

Gel-Puffer

7,2	g	Urea
5,63	ml	40% Acrylamid/Bis-acrylamid (37,5:1)
1,5	ml	10x TBE

erwärmen bis der Harnstoff gelöst ist, anschließend die folgenden Reagenzien hinzufügen

1,9	ml	Aqua dest. (Rnase-frei)
75	µl	10% APS
7,5	µl	TEMED

Gellaufpuffer

1x TBE (angesetzt mit RNase-freiem Wasser)

2.11.9 Northern Blot

Das Übertragen (Blotten) der gelelektrophoretisch aufgetrennten RNA (Kap. 2.11.8.2) auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte unter Verwendung einer Semi-Dry-Apparatur und ermöglichte im Anschluss die spezifische Detektion von RNA-Sequenzen durch die Hybridisierung mit komplementären, radioaktiv-markierten Gensonden.

Für den Elektro-Blot wurden sechs Blätter Whatman-Papier und ein Blatt Hybond-N⁺-Nitrocellulose-Membran in der Größe des PAGE-Gels zugeschnitten und in 0,25x TBE-Puffer getränkt. Der Blotaufbau setzte sich aus drei Blättern Whatman-Papier, der Nylonmembran, dem PAGE-Gel und abschliessend drei weiteren Whatmann-Papieren

zusammen (von unten nach oben). Die Berechnung der benötigten Stromstärke erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{mA} = \text{Laufzeit [h]} \times \text{Gelgröße [cm}^2\text{]} \times 3 \text{ mA}$$

Nach dem Transfer der RNA auf die Nitrocellulose-Membran wurde die RNA durch UV-Bestrahlung (autocrosslink) auf der Membran immobilisiert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der Northern-Blots abgedunkelt bei RT.

2.11.10 Radioaktiv-Markierung der DNA-Gensonden mit γ -³²P-ATP

Der Nachweis der miRNA, die auf die Nitrocellulose-Membran transferiert worden war, erfolgte mit γ -³²P-ATP. Dabei wurde das Phosphat von ³²P-ATP mittels T4-Kinase an das 5'-Ende der komplementären miRNA-Sonde übertragen und diese so markierte Sonde in die Hybridisierung eingesetzt.

Zunächst erfolgte die radioaktive Markierung der *small RNA Fraction* (Kap. 2.11.1.2) unter Verwendung des ³²P-Markierungspuffers für eine Stunde bei 37°C im Heizblock. Anschließend wurden überschüssige ATPs unter Verwendung des *Nucleotid Removal Kits* (Qiagen, Anwendung gemäß der Herstelleranleitung) entfernt. Die Elution der radioaktiv-markierten miRNA-Sonde erfolgte mit 100 µl Elutionspuffer. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

³²P-Markierungspuffer

0,5	µl	Oligonukleotid (100 pmol/µl)
1	µl	Reaktionspuffer
2,5	µl	γ - ³² P-ATP
1	µl	T4-Polynukleotid-Kinase

2.11.11 Hybridisierung mit radioaktiv-markierten Gensonden

Die Hybridisierung der auf der Nitrocellulose-Membran immobilisierten RNA mit komplementären, radioaktiv-markierten Sonden erfolgte in bei 37-41°C im Hybridisierungsofen. Die Nitrocellulose-Membran wurde im Vorfeld der Hybridisierung mit dem Blockierungspuffer für 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 10

µl der denaturierten (10 min, 95°C) radioaktiv-markierten Sonde, die an komplementäre Sequenzen binden kann. Als Ladekontrolle wurde U6 snRNA radioaktiv-markierte Sonde in einer Verdünnung von 1:100 mitgeführt. Am nächsten Morgen wurde die Membran 1 mal mit Waschlösung 1 und 2 mal mit Waschlösung 2 gründlich für jeweils 10 min mit zunehmender Stringenz gewaschen und anschliessend auf einem Röntgenfilm aufgebracht. Der Nachweis erfolgte durch die Exposition des Films bei -80°C und der Entwicklung des Films nach 1 Woche.

Blockierungspuffer

5	x	SSC
1	% (w/v)	SDS
1	x	Denhardts
20	mM	Na ₂ PO ₄
30	µl	Heringssperma-ssDNA

Hybridisierungspuffer

5	x	SSC
1	%	SDS

Waschlösung 1

5	x	SSC
1	% (w/v)	SDS

Waschlösung 2

1	x	SSC
1	% (w/v)	SDS

2.11.12 Nachweis von RNA im Anschluss an die Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Silberfärbung nach Blum et al. (Blum et al., 1987) stellt eine empfindliche Methode zum Nachweis von RNA und Proteinen dar. Zunächst wurde das zu färbende Gel für 15 min in der Fixierlösung inkubiert, um anschließend mit der Silber-Färbelösung behandelt zu werden. Nach zweimaligem, kurzem Waschen des gefärbten Gels mit Aqua dest. wurde das Gel für 1-2 h in Entwicklerlösung inkubiert, bis deutliche Banden zu erkennen waren. Die Entwicklungsreaktion wurde mit Aqua dest. abgestoppt. Die Gele wurden zur Dokumentation eingescannt und konnten für eine längere Lagerung getrocknet werden.

Fixierlösung

10	%	Ethanol
0,5	%	Essigsäure

Silberfärbelösung

1,9	g/l	Silbernitrat
-----	-----	--------------

Entwicklerlösung

1,5	%(w/v)	Natronlauge
0,08	%	Natriumborhydrid
0,15	%	Formaldehyd

2.12 DNA-Chip-Technologie

Die DNA-Chip-Technologie (=Microarrays) erlaubt die Untersuchung differentieller Muster in der Genexpression unterschiedlichster Zellpopulationen. Die im Rahmen dieser Arbeit angewandte Herstellungstechnologie beruht in der Basis auf dem an der Stanford University (San Fransisco, CA, USA) entwickelten System (Shalon et al., 1996). Dabei wurden die für verschiedene miRNA-Gene kodierenden Gensonden (Oligonukleotide einer Länge von 21 bis 26 Nukleotiden) auf eine chemisch veränderte Glasoberfläche aufgebracht und auf einem Microarray zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Proben gleichzeitig hybridisiert (siehe Abb. 2.4; Shalon et al., 1996).

2.12.1 Herstellung von DNA-Chip-Trägern (Microarrays)

Für die spätere Manufaktur von Microarrays und die Immobilisierung der DNA auf den DNA-Chip-Trägern wurden normale Glasobjektträger chemisch modifiziert.

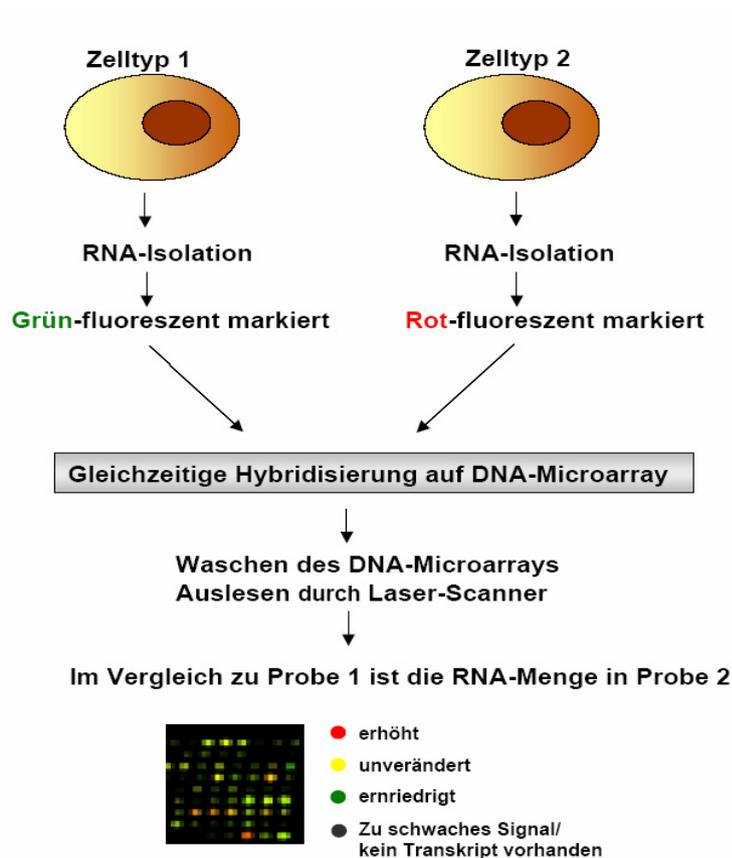


Abb. 2.4: Prinzip der simultanen Genexpressionsanalyse unter Verwendung von DNA-Microarrays.

Nach der Isolation der RNA werden diese mit Cy3 (grün) oder Cy5 (rot) Fluoreszenz-markiert und gleichzeitig auf dem Microarray hybridisiert. Anschliessend werden die RNA-Spiegel anhand der Fluoreszenzstärke ermittelt und dadurch differentiell exprimierte Gene bestimmt.

2.12.1.1 Produktion von Amin-aktivierten Objektträger*Schritt 1: Reinigung der unbehandelten Glasobjektträger*

Um die Oberfläche der Glasobjektträger für die Beschichtung mit verschiedenen Reagenzien vorzubereiten, wurden die Mikroskopobjektträger für 2 Stunden in Ethanol mit 10% (w/v) NaOH eingetaucht und anschliessend viermal gründlich mit Aqua ad iniectabilia (Braun) und abschliessend mit HPLC-Wasser (Merck) gespült. Zum Trocknen wurden die Objektträger für 5 Minuten bei 500 rpm und RT zentrifugiert.

Schritt 2: Silanisierung der Microarrayslides

Für die spätere Immobilisierung der DNA-Sonden wurde die Glasoberfläche unter Verwendung von 3-Glycidoxypropyl-trimethoxysilan (GPS) chemisch modifiziert. Dafür wurden die gereinigten Objektträger für 15 Minuten in eine Lösung mit 2% (v/v) GPS in Methanol p.A. getaucht, 2 Mal mit Ethanol p.A. gewaschen und mittels Zentrifugation getrocknet (5 min, 500 rpm, RT). Abschliessend wurden die Objektträger für 15 min bei 110°C im Trockenschrank gebacken.

2.12.1.2 Präparation der Oligonukleotide für das Spotten

Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotiden, die an ihrem 5'-Ende eine Amino-Modifikation aufweisen, repräsentiert jedes einzelne ein annotiertes miRNA-Gen. Die lyophilisierten Sonden, die in einer eingestellten DNA-Konzentration von 100 µM von der Firma Operon geliefert wurden, wurden zum Rehydratisieren in 3x SSC (20x SSC ist ein Puffer bestehend aus 3 M Natriumchlorid und 0.3 M Natriumcitrate, pH 7.0) aufgenommen und auf die benötigte Konzentrationen von 40 µM verdünnt.

2.12.1.3 Herstellung von Microarrays

Die Herstellung der miRNA-Chips erfolgte unter Verwendung eines Computer-gesteuerten Robotersystems im Labor von Prof. Wendisch, Forschungszentrum Jülich wie im MGUIDE beschrieben (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>).

Die Oligonukleotidsonden wurden durch mechanisches Spotten mit einem Roboter auf die Glasobjektträger aufgebracht. Der Druckkopf des Roboters besitzt 16 sogenannte *split pins* (Nadeln mit einem Spalt). Dieser Spalt nimmt etwa 1 μl der zu immobilisierenden Flüssigkeit aus einem Loch einer 384-Loch-Mikrotiterplatte auf und gibt durch den Kontakt mit der Glasoberfläche ca. 5 nl der DNA-Lösung pro Spot (aufgebrachter Flüssigkeitstropfen) ab. Aufgrund des Flüssigkeitsreservoirs (Spalt der Nadeln) kann so auf bis zu 135 Objektträger hintereinander dieselbe DNA-Lösung aufgebracht werden. Dieser Ablauf der Entnahme der DNA-Lösung mit dem sequentielle Auftragen auf mehrere Objektträger entspricht einem Zyklus.

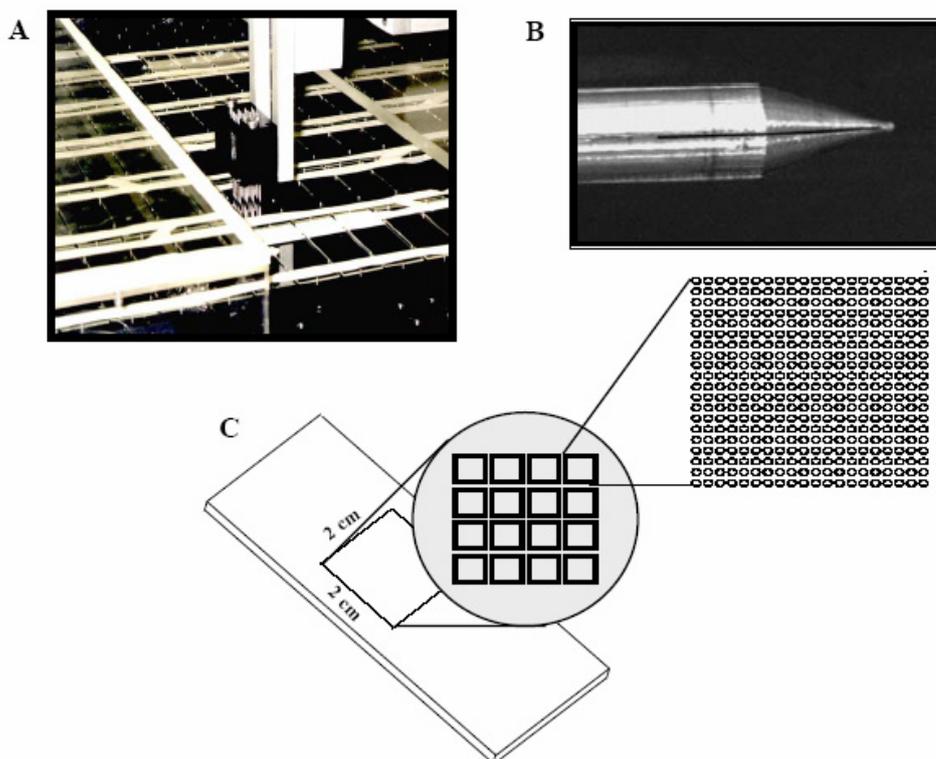


Abb. 2.5: Microarray-Herstellung Auftragen der zu immobilisierenden Gensonden mit Hilfe des 16-Nadel-Druckkopfes (A) unter Verwendung einer typischen Nadel mit 20 μm Spalt zur Aufnahme der Spottinglösung (*split pins*, B). Schematische Darstellung der resultierenden Sondauftragung (C). Jede der 16 Nadeln hinterlässt maximal 20x20 Spots in dem durch sie hergestellten Spotquadrat.

Um das Vermischen der DNA-Sequenz des folgenden Zyklus mit Resten von DNA im Spalt der Nadeln aus dem vorherigen Zyklus zu verhindern, wurden die Nadeln gewaschen. Dafür fuhr der Pipettierkopf automatisch zu einem Ultraschallbad, wurde in die darin enthaltene 1x SSC-Lösung für 10 s eingetaucht und anschliessend luftgetrocknet (Shalon et al., 1996). Dieser Reinigungsschritt wurde insgesamt 3 mal wiederholt, bevor in einem neuen Zyklus die zu immobilisierende Lösung aufgenommen wurde. Mit Hilfe der 5- μm -genauen Computersteuerung des Pipettierroboters erfolgte das Auftragen der Lösung auf den Glasobjektträger örtlich versetzt. Die sich dabei bildenden runden Flüssigkeitstropfen haben einen Durchmesser von circa 100 μm mit einem mittleren Spotabstand von 230 μm , so dass ein Vermischen zweier Spots ausgeschlossen werden konnte. Die Spot-Qualität war optimal bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 30% und einer umgebenden Temperatur von 23°C. Nach dem Spotten und dem Trocknen der aufgetragenen Gensonden wurden die miRNA-Chips im Dunkeln gelagert.

2.12.2 Post-Hybridisierungsschritte

Bevor die hergestellten DNA-Chips in Hybridisierungsexperimenten eingesetzt werden konnten, erfolgte das Blockieren freier Bindestellen und eine Immobilisierung der DNA. Die DNA wurde an die chemisch-modifizierte Glasoberfläche unter Verwendung eines Stratalinkers gebunden (150 mJ/cm^2). Anschliessend wurden die Microarrays für 1 h in BSA-haltiger SSC-Lösung unter ständigem orbitalen Schütteln inkubiert, wodurch freie Bindestellen blockiert wurden, und danach 3 mal gründlich mit A.dest. gewaschen. Abschliessend wurden die Glasobjektträger mittels Zentrifugation (5 min, 900 rpm, RT) getrocknet und sofort in die Hybridisierung eingesetzt.

Die kommerziellen CodeLink-Objektträger wurden gemäß in den Anweisungen der Hersteller vorbehandelt.

Blockierungslösung

2	x	SSC
1	%(w/v)	BSA

2.12.3 Fluoreszenzmarkierung der RNA

Für den Vergleich der miRNA-Genexpression wurden fluoreszenz-markierte small RNA-Fractionen (Kap. 2.11.1.2) gleicher Menge in die Hybridisierung eingesetzt. Für die Markierung der RNA wurde entweder für die Einzelfarbenanalyse das *Labeling-IT-Kit* (Mirus, Molecular Probes) verwendet, oder für die simultane Genexpressionsanalyse (*dual colour*-Analyse) zweier Proben die RNA unter Verwendung des *mirVana* miRNA-Labeling Kits (Ambion) verwendet.

Bei der Verwendung des *Labeling-IT-Kits* werden Guaninreste der RNA direkt ohne enzymatischen Schritt mit Cy-3-Farbstoffen markiert (Markierung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll).

Mit Hilfe des *mirVana* miRNA-Labeling Kits konnte eine *dual colour*-Analyse durchgeführt werden. Dafür wird der Probe in einem ersten Schritt unter Verwendung einer *E. coli* Poly(A) Polymerase ein Schwanz aus amin-modifizierten und unmodifizierten Nukleotiden angehängt. Nach der Aufreinigung der amin-modifizierten RNA wurden diese mit Cy-Farbstoffe inkubiert. Diese besitzen amin-reaktive Reste und bilden ein NHS-Ester mit den amin-modifizierten Nukleotiden der RNA. (Die Markierung erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll).

Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden Cy3- ($\lambda_{\text{Ex max}}$ 550 nm, $\lambda_{\text{EM max}}$ 570 nm) und Cy5- ($\lambda_{\text{Ex max}}$ 649 nm, $\lambda_{\text{EM max}}$ 670 nm) NTPs eingesetzt. Diese fluoreszenz-markierten RNAs wurden in die Hybridisierung eingesetzt.

2.12.4 DNA-Chip-Hybridisierung

Zur Bestimmung der relativen Genexpression in unterschiedlichen Proben wurden die fluoreszenz-markierten Proben (Kap. 2.12.3) auf einem Chip hybridisiert. Bei der Durchführung einer Zweifarben-Analyse wurden die Proben vereinigt. Zur Hybridisierung wurden die Proben in einem Endvolumen von 25 μl vorgewärmten Hybridisierungspuffer (gemäß verwendetem Protokoll) und für 3 min bei 65°C denaturiert. Anschliessend wurde die Probe über den gesamten Bereich der immobilisierten DNA (2 x 2 cm) verteilt. Dafür wurde ein Spezialdeckgläschen über diesen Bereich platziert, das eine gleichmässige Verteilung der Probenlösung über die DNA-Chip-Fläche gewährleistete (Lifter Slip, Erie Scientific). Um eine Austrocknung der Probenlösung während der Hybridisierung zu

verhindern, wurden kleine Flüssigkeitstropfen, bestehend aus 3x SSC, auf den Objektträgerrand aufgebracht.

Die Hybridisierung erfolgte in dichten Hybridisierungskammern (Die Tech Inc.) für mindestens 16 h bei 42°C und einem leichten Schütteln (200 rpm) im Hybridisierungsöfen. Zum Entfernen der Probenlösung wurden die Chips im Anschluss an die Hybridisierung mit zunehmender Stringenz gewaschen (2 mal 1x SSC, 1 mal 0,5x SSC) und abschliessend getrocknet (Zentrifugation 5 min, RT, 500 rpm). Die Bestimmung der gebundenen Fluoreszenz erfolgte mittels Laser-Scanner (Kap. 2.12.5).

2.12.5 Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von DNA-Chips

Zur Bestimmung der relativen RNA-Spiegel wurde die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz der Spots gemessen. Dabei korreliert das Verhältnis von Cy3- und Cy5-Fluoreszenz eines Spots direkt mit dem Verhältnis der RNA-Moleküle in den beiden verglichenen Proben und kann deshalb als Mass für den relativen RNA-Spiegel verwendet werden (Shalon et al., 1996).

Zum Messen der Fluoreszenz eines DNA-Spots wurde der GenePix 4000B Laser Scanner (Axon) verwendet. Dieser bestrahlt die Chip-Oberfläche (10 x 10 µm Raster) zum Anregen der Cy3- und Cy5-Fluoreszenzfarbstoffe mit monochromatischem Licht zweier Wellenlängen (532 nm zur Anregung von Cy3 und 635 nm zur Anregung von Cy5) und registriert die emittierende Fluoreszenz der Farbstoffe mit Hilfe lichtempfindlicher Kathoden, welche die Cy3- und Cy5-Fluoreszenzen in Strom umwandeln. Diese Stromstärke korreliert direkt mit der Fluoreszenzstärke und wird von der GenePix Software numerischen Intensitäten auf einer Skala von 0 bis 65535 zugeordnet (GenePix Pro 4.1, Axon). Mit Hilfe der Software wurden diese ortsauflösenden Informationen als Fluorogramme dargestellt und konnten als TIFF-Formate elektronisch abgespeichert werden. Diese Fluorogramme wurden mit der GenePix Pro 4.1 Software quantitativ analysiert. Die Software ermittelte den Medianwert der Cy3- und Cy5-Fluoreszenzen eines Spots innerhalb eines markierten Bereichs (Abb. 2.6A und B) und nach Subtraktion der jeweiligen Medianwerte der Hintergrundintensitäten wurde das Verhältnis der Cy3-/Cy5-Netto-Fluoreszenzen berechnet (Abb. 2.6C). Dieses Verhältnis wurde verwendet, um den relativen Spiegel der miRNA-Expression anzugeben.

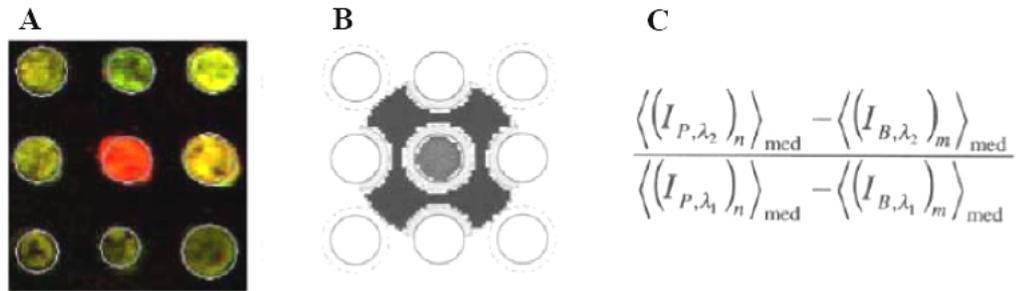


Abb. 2.6: Fluoreszenzanalyse unter Verwendung der GenePix 4.1 Software

A) Die Quantifizierung der Fluoreszenz der einzelnen Spots auf den Microarrays erfolgte im Anschluss an das Scannen des Microarrays mit dem GenePix 4000B Laser Scanner unter Verwendung der GenePix 4.1 Software. B) Schematische Darstellung der Quantifizierung der Spot-Fluoreszenz. Alle Bildpunkte innerhalb des Kreises (hellgrau) gehören zum Spot und werden in die Analyse mit einbezogen. Die dunkelgraue Kreisregion hebt die Bildpunkte des Hintergrundes hervor. C) Formel zur Berechnung des Cy3-/Cy5-Netto-Fluoreszenz-Verhältnisses eines Spots. (Dem Handbuch zu GenePix Pro 3.0 Software entnommen).

2.12.6 Statistische Auswertungen

2.12.6.1 Cluster-Analyse

Die Cluster-Analyse ermöglicht es, aus der Gesamtheit der Expressionsdaten die relevanten, differentiell exprimierten Gene herauszufiltern und diese aufgrund ihrer Ähnlichkeit in einer Gruppe (*cluster*) anzuordnen. Dafür wurden bei der Anwendung von miRNA-Chips normalisierte Cy3-/Cy5- Fluoreszenzenverhältnisse verwendet, während bei der Analyse der Real-Time PCR-Daten normalisierte (ΔCt -Werte) benutzt wurden.

Die im Rahmen dieser Arbeit angewandte Methode der nicht-überwachten hierarchischen Anordnung (*unsupervised hierarchical clustering*) beruht auf der von Eisen et al, 1998 beschriebenen Methode. Dabei werden schrittweise einzelne Objekte aufgrund ähnlicher Charakteristika zu Clustern und weiterführend diese zu grösseren Gruppen zusammengefasst. Die dabei entstehende Baumstruktur wird in einem Dendrogramm dargestellt. Das Dendrogramm gibt Aufschluss über die Ähnlichkeit der untersuchten Datenpunkte. So enthält die Wurzel noch alle Datenpunkte der untersuchten Menge und repräsentiert nur ein einziges Cluster. Die Äste stellen die Untergruppen der Wurzel da; darin ist nur noch eine Teilmenge der Wurzel lokalisiert. Die Blätter repräsentieren je ein einzelnes Objekt der Datenmenge (Gen). Ein Knoten stellt die Vereinigung einzelner Untergruppen dar. Jede Kante zwischen zwei Knoten stellt die Distanz zwischen den beiden repräsentierenden Mengen von Objekten dar und zeigt somit die Ähnlichkeit zwischen diesen beiden Mengen an (siehe Abb. 2.7).

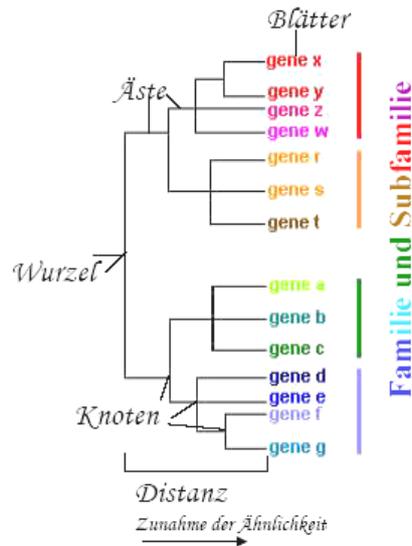


Abb. 2.7: Dendrogramm einer nicht-unterstützten hierarchischen Sortierung nach Eisen (1998)

Die den relativen Expressionsstärken entsprechenden Fluoreszenzverhältnisse wurden in einer bildlichen Darstellung der Clusteranalyse in roten und grünen Farbkodierungen angezeigt. Wenn nicht anders angemerkt, entsprach rot dabei einer Zunahme der Expression, während grün einen geringeren RNA-Spiegel wiedergab. Schwarz symbolisiert unveränderte Expressionsstärken und grau kodiert für einen nicht auswertbaren Datenpunkt. Für die hierarchische Sortierung und zur bildlichen Darstellung wurde eine selbstentwickelte Software verwendet (freundlicherweise von Dr. Polen, FZ Jülich zur Verfügung gestellt).

2.12.6.2 Venndiagramm

Bei einem Venndiagramm handelt es sich um die graphische Darstellung der kategorischen Aussagen der Klassenlogik unter Verwendung von Mengendiagrammen und beruht auf Arbeiten von John Venn (1834 bis 1923). Es werden alle Kombinationen berücksichtigt (siehe Abb. 2,8). So stellt die mittlere Schnittmenge (1/2/3) all die Gene dar, die in jeder der drei Mengen (Proben) vorhanden ist. Die Schnittmengen (1/2; 1/3; 2/3) beinhalten die gemeinschaftlichen Gene der jeweiligen Probe, während der Kreis ohne eine Überlappung (1; 2; 3) Proben-spezifische Gene widerspiegelt.

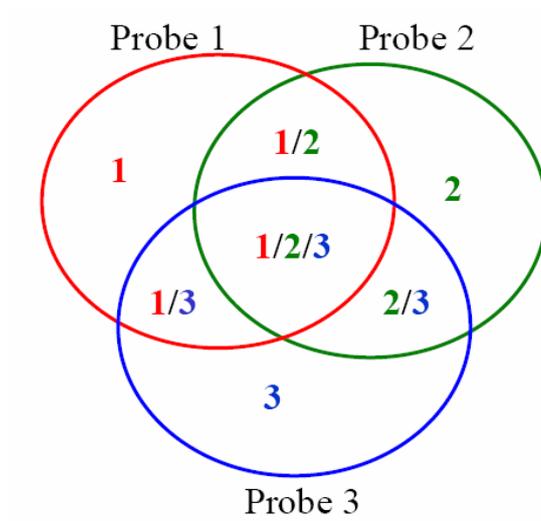


Abb. 2.8: Venndiagramm zur graphischen Darstellung der Mengenverteilung.

3 Ergebnisse

MicroRNAs (miRNAs) konnten in allen bisher untersuchten eukaryontischen Organismen nachgewiesen werden und sind in eine Vielzahl regulatorischer Prozesse involviert (Bartel, 2004). Unter anderem spielen sie eine wichtige Rolle in Differenzierungsprozessen und konnten in verschiedenen Zellpopulationen der Hämatopoese nachgewiesen werden (Kluiver et al., 2006; Song and Tuan, 2006). Eine umfassende und vergleichende Analyse der miRNA-Expression im Verlauf der Differenzierung von der humanen hämatopoietischen Stammzelle zu reifen hämatopoietischen Endstufen ist jedoch noch nicht beschrieben worden.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, Methoden zu entwickeln und zu etablieren, die eine globale Untersuchung der miRNA-Expression erlauben.

Unter Verwendung der optimalen Methode wurde die miRNA-Expression vergleichend in den unterschiedlichen Subpopulationen der hämatopoietischen Stammzelle und ausdifferenzierten Zelltypen der Myelopoese sowie Lymphopoese untersucht.

Weiterführende Analysen wurden mit Subpopulationen der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) durchgeführt. Auch hier wurden die Aspekte der miRNA-Biogenese im Verlauf der Differenzierung unreifer in reife Zelltypen untersucht.

3.1 Entwicklung einer Microarray-Plattform zur Analyse der miRNA-Expression

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Microarray-Plattform zur Analyse von mRNA-Expressionsprofilen etabliert. Es wurden 70 Nukleotid-lange Oligonukleotide auf unterschiedliche, im Labor selbst hergestellte Oberflächenbeschichtungen sowie kommerziell erhältlich Objektträger aufgebracht und die optimale Konzentration der immobilisierten Sonden, die beste Markierungsmethode sowie Hybridisierungsmethode der zu untersuchenden Probe analysiert. Diese hierbei erlangten Resultate ermöglichten eine rasche Etablierung eines miRNA-Microarrays zu Untersuchung der differentiellen Genexpression in diversen Zelltypen.

Für den miRNA-Microarray (miRNA-Chip) wurden 294 verschiedene miRNA-Oligonukleotidsequenzen von der Firma Operon synthetisiert, die am 5'-Ende einen

Abstandshalter aufwiesen. Dieser Spacer sollte eine gerichtete Immobilisierung der Sonde ermöglichen, so dass die Oligonukleotide nicht aufgrund ihrer negativen Ladung horizontal an die Oberfläche binden, sondern eine aufgerichtete, vertikale Orientierung aufweisen und so eine bessere Zugänglichkeit der RNA-Proben an die Sonde ermöglichen.

3.1.1 Sensitivität der miRNA-Chips

Um die erfolgreiche Immobilisierung der Sonden auf die Objektträger zu überprüfen, wurden die mit einer Epoxid-Beschichtung modifizierten Glasobjektträger (=GPS2, wie unter 2.12.1.1 beschrieben) mit kommerziellen, die gleiche chemische Oberfläche aufweisenden Objektträgern verglichen (CodeLink, GE HealthCare). Dazu wurde jeweils 1 µg der angereicherten *small RNA Fraction* von HeLa (Kap. 2.11.1.2) unterschiedlich fluoreszenzmarkiert (Cy3 = grün; Cy5 = rot) und auf den Microarrays hybridisiert. In Abbildung 3.1 sind Ergebnisse der Hybridisierungen von HeLa-RNA unter Verwendung zweier Markierungsmethoden auf die unterschiedlichen, chemisch-modifizierten Oberflächen dargestellt. Es wird deutlich, dass in Abhängigkeit von der benutzten Markierungsmethode der miRNA unterschiedlich starke Fluoreszenzsignale detektiert werden konnten. Während die Einfarben-Analyse unter Verwendung des MirusLabelingKits (siehe Kap. 2.12.3) auf der kommerziellen Oberflächenchemie sehr gute Ergebnisse erzielte, konnten bei einer Zweifarbenstrategie (Dual-Colour-Hybridisierung) mit den in Eigenproduktion hergestellten miRNA-Chips die besseren Ergebnisse erzielt werden. Der Vorteil der Zweifarben-Analyse ist, dass zwei Proben auf dem selben Chip analysiert werden können und so der direkte Vergleich zwischen beispielsweise Probe und Kontrolle im Rahmen desselben Experimentes erfolgt. Während die CodeLink-Chips in der Dual-Colour-Hybridisierung sehr schwache bis keine Hybridisierungssignale aufwiesen, war die Sensitivität der eigenproduzierten GPS2-Chips sehr gut (Abb. 3.1). Es konnten in Abhängigkeit von der gespotteten Oligokonzentration unterschiedlich starke Fluoreszenzwerte bestimmt werden (Daten nicht dargestellt). Die gelben Farbsignale resultieren aus der Zweifarbenanalyse und der Überlagerung der dabei erzielten roten und grünen Fluoreszenzwerte.

Markierungsmethode	Mirus Labeling Kit	mirVana Labeling Kit	mirVana Labeling Kit
Fluoreszenz	Einfarben-Analyse	Zweifارben-Analyse	Zweifarben-Analyse
Chipoberfläche	CodeLink	CodeLink	GPS2

Abb. 3.1: Hybridisierungsergebnisse der miRNAs in Abhängigkeit der verschiedenen Objektträgeroberflächen und Markierungsmethoden. Die dargestellten sind die eingescannerten Microarrays.

Der Vergleich der Daten zeigte, dass die selbst-hergestellten miRNA-Chips eine effiziente Immobilisierung und gute Hybridisierung mit miRNA-Sonden zur Bestimmung relativer Expressionsspiegel bei der Verwendung der Dual-Colour-Hybridisierung ermöglichten

3.1.2 Spezifität der miRNA-Chips

Zur Kontrolle der Spezifität der GPS2-miRNA-Chips wurden Vergleiche mit publizierten Daten durchgeführt. Dafür wurden die ermittelten Fluoreszenzwerte mit Expressionsdaten von HeLa, die unter Verwendung einer TaqMan-basierenden Real-Time-PCR im Verlauf dieser Arbeit gewonnen wurden (Kap. 2.11.7.2), verglichen, sowie die von Nelson et al. (Nelson et al., 2004) veröffentlichten miRNA-Daten in die Analyse mit einbezogen. Zudem wurde die Stärke der Hybridisierungssignale mit den Klonfrequenzen der Tuschl-Datenbank (Landgraf et al., 2007) verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Korrelation der miRNA-Expression unter Verwendung verschiedener Methoden.

1) Expressionswerte (Ct-Werte), welche mittels TaqMan-basierender PCR ermittelt wurden (*human panel early access kit*)

2) miRNA-Microarray-Profile von Nelson et al., 2004

3) Frequenz der miRNA, die unter Verwendung einer Klonierungsmethode ermittelt wurde (Landgraf et al., 2007)

nv = Sonde auf dem Microarray nicht vorhanden

Method/ _{miRNA}	microarray-ITZ		TaqMan-PCR ¹		Microarray-Literatur ²	Klondatenbank ³	
miRNA Names	Fluoreszenz	Signalstärke	Ct-Wert	Signalstärke	Signalstärke	HeLa #1	HeLa #2
miR-23b	3771	hoch	17	hoch	kein Signal	0.002	0.006
miR-23a	3554	hoch	16,1	hoch	hoch	0.031	0.006
miR-181a	2330	hoch	18,86	hoch	kein Signal	0.000	0.000
miR-30d	1066	mittel	18,01	hoch	nv	0.008	0.011
miR-29a	1136	mittel	22,33	mittel	hoch	0.008	0.002
miR-24	1890	mittel	16,81	hoch	hoch	0.024	0.013
miR-22	1077	mittel	18,78	hoch	hoch	0.005	0.002
miR-21	1370	mittel	15,33	hoch	hoch	0.142	0.094
miR-19b	1385	mittel	16,42	hoch	kein Signal	0.005	0.002
miR-17-5p	1119	mittel	18,36	hoch	nv	0.027	0.032
miR-16	1314	mittel	17,93	hoch	hoch	0.120	0.100
let-7c	1501	mittel	19,73	hoch	kein Signal	0.011	0.023
let-7b	1177	mittel	17,35	hoch	hoch	0.034	0.066
miR-30e-5p	480	schwach	25,87	schwach	nv	0.013	0.006
miR-30c	780	schwach	18,15	hoch	kein Signal	0.006	0.002
miR-30b	430	schwach	18,85	hoch	nv	0.005	0.000
miR-30a-5p	953	schwach	19,21	hoch	nv	0.000	0.000
miR-29c	484	schwach	22,52	mittel	hoch	0.000	0.000
miR-29b	950	schwach	21,29	mittel	hoch	0.032	0.011
miR-27b	750	schwach	17,96	hoch	mittel	0.008	0.015
miR-27a	660	schwach	15,98	hoch	mittel	0.048	0.032
miR-26a	840	schwach	24,13	mittel	mittel	0.003	0.004
miR-25	450	schwach	18,62	hoch	schwach	0.013	0.000
miR-222	550	schwach	17,24	hoch	kein Signal	0.002	0.000
miR-213	473	schwach	23,2	mittel	kein Signal	0.000	0.000
miR-210	431	schwach	19,41	hoch	kein Signal	0.000	0.000
miR-20a	474	schwach	20,06	hoch	hoch	0.011	0.017
miR-208	501	schwach	25,08	schwach	kein Signal	0.000	0.000
miR-206	506	schwach	28,64	schwach	nv	0.000	0.000
miR-205	415	schwach	22,6	mittel	kein Signal	0.000	0.000
miR-200e	415	schwach	24,79	schwach	nv	0.000	0.000
miR-200a	428	schwach	25,07	schwach	nv	0.000	0.000
miR-19a	822	schwach	16,14	hoch	hoch	0.003	0.006
miR-199a	403	schwach	25,58	schwach	kein Signal	0.000	0.000
miR-195	450	schwach	23,6	mittel	nv	0.000	0.000
miR-193a	424	schwach	22,34	mittel	nv	0.002	0.000
miR-191	460	schwach	17,8	hoch	nv	0.003	0.023
miR-190	407	schwach	24,82	schwach	nv	0.000	0.000
miR-18a	460	schwach	20,34	mittel	schwach	0.000	0.004
miR-181c	403	schwach	21,29	mittel	kein Signal	0.000	0.000
miR-181b	619	schwach	21,22	mittel	kein Signal	0.000	0.000
miR-15b	625	schwach	18,59	hoch	nv	0.002	0.002
miR-150	463	schwach	20,85	mittel	nv	0.000	0.000
miR-145	685	schwach	27,62	schwach	nv	0.000	0.000
miR-136	407	schwach	27,91	schwach	nv	0.000	0.000
miR-130b	408	schwach	19,03	hoch	kein Signal	0.000	0.002
miR-130a	625	schwach	22,06	mittel	kein Signal	0.000	0.000
miR-128a	402	schwach	20,97	mittel	nv	0.000	0.000
miR-125b	478	schwach	17,78	hoch	nv	0.011	0.008
miR-125a	563	schwach	20,3	mittel	nv	0.003	0.000
miR-107	717	schwach	21,77	mittel	kein Signal	0.000	0.000
miR-106b	547	schwach	19,88	hoch	hoch	0.010	0.006
miR-103	528	schwach	18,57	hoch	hoch	0.000	0.002
miR-100	779	schwach	21,11	mittel	hoch	0.002	0.002
let-7i	446	schwach	19,12	hoch	nv	0.008	0.019
let-7d	566	schwach	19,38	hoch	kein Signal	0.005	0.008
miR-30a-3p	393	Hintergrund	19,29	hoch	nv	0.073	0.051
miR-299-5p	260	Hintergrund	24,07	mittel	nv	0.000	0.000
miR-296	334	Hintergrund	20,65	mittel	nv	0.000	0.000
miR-28	316	Hintergrund	23,06	mittel	kein Signal	0.005	0.002
miR-26b	360	Hintergrund	21,71	mittel	mittel	0.000	0.008
miR-223	300	Hintergrund	21,22	mittel	kein Signal	0.000	0.000
miR-219	260	Hintergrund	29,33	Hintergrund	kein Signal	0.002	0.000
miR-218	260	Hintergrund	33,5	Hintergrund	kein Signal	0.003	0.002
miR-216	299	Hintergrund	21,08	mittel	kein Signal	0.000	0.000
miR-214	375	Hintergrund	23,94	mittel	kein Signal	0.000	0.000
miR-212	367	Hintergrund	24,93	schwach	kein Signal	0.000	0.000
miR-200b	238	Hintergrund	25,68	schwach	kein Signal	0.000	0.000
miR-196b	328	Hintergrund	22,03	mittel	kein Signal	0.005	0.002
miR-196a	390	Hintergrund	28,26	schwach	kein Signal	0.011	0.002
miR-194	324	Hintergrund	25,27	schwach	nv	0.006	0.000
miR-186	290	Hintergrund	20,64	mittel	nv	0.000	0.008
miR-185	360	Hintergrund	23,63	mittel	nv	0.002	0.000
miR-184	218	Hintergrund	20,65	mittel	nv	0.000	0.000
miR-183	390	Hintergrund	21,57	mittel	kein Signal	0.000	0.006
miR-154	294	Hintergrund	23,1	mittel	nv	0.000	0.000
miR-152	294	Hintergrund	25,12	schwach	nv	0.000	0.000
miR-148b	300	Hintergrund	22,71	mittel	kein Signal	0.002	0.000
miR-146a	222	Hintergrund	23,04	mittel	nv	0.000	0.000
miR-144	289	Hintergrund	24,4	schwach	nv	0.000	0.000
miR-143	304	Hintergrund	27,86	schwach	kein Signal	0.000	0.000
miR-138	222	Hintergrund	28,45	schwach	nv	0.000	0.000
miR-135b	335	Hintergrund	26,82	schwach	nv	0.000	0.000
miR-135a	199	Hintergrund	25,62	schwach	nv	0.000	0.000
miR-133a	382	Hintergrund	21,17	mittel	nv	0.000	0.000
miR-132	382	Hintergrund	21,09	mittel	nv	0.000	0.000
miR-128b	322	Hintergrund	25,05	schwach	nv	0.000	0.000
miR-126*	312	Hintergrund	23,3	mittel	nv	0.000	0.000
miR-126	323	Hintergrund	26,61	schwach	nv	0.000	0.019
miR-122a	338	Hintergrund	26,95	schwach	nv	0.000	0.000
miR-10a	119	Hintergrund	26,36	schwach	kein Signal	0.000	0.000
miR-101	214	Hintergrund	25,71	schwach	kein Signal	0.002	0.002
let-7e	233	Hintergrund	17,76	hoch	kein Signal	0.000	0.004
miR-142-5p	nv	/	25,46	schwach	kein Signal	0.029	0.000
miR-141	nv	/	24,48	schwach	kein Signal	0.002	0.000
miR-139	nv	/	29,83	Hintergrund	kein Signal	0.002	0.000

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Daten alle unter Verwendung verschiedener Methoden generiert wurden, konnte zusammenfassend eine befriedigende Korrelation zwischen den einzelnen Analysemethoden festgestellt werden. So waren die gemessenen Hybridisierungssignale auf einem vergleichbaren Niveau, während für die miRNA-Sonden, welche bei dem vergleichenden miRNA-Microarray keine Signale aufzeigten, auch auf dem miRNA-Chip keine Signale detektiert wurden. Korrelierend dazu wurden für diese miRNAs auch bei der Klonierungsmethode keine Klone gefunden. Der Vergleich mit der TaqMan-basierenden PCR-Methode zeigte ebenfalls zufriedenstellende Ergebnisse. Allerdings können mit dieser Methode sehr viel geringere Mengen nachgewiesen werden, so dass das Detektionsspektrum breiter ist.

Zusätzlich wurde die Spezifität des miRNA-Chips anhand von Mitgliedern der miRNA-Familie let-7 sowie an *Mismatch*-Sonden (MM) auf dem Chip getestet (Abb. 3.2)

A

miRNA	Sequenz	Klondaten	Chip
let 7-a	AACTATACAACCTACTACCTCA *	-1	9488
let 7-b	AACCA C ACAACCTACTACCTCA	-2	8243
let 7-c	AACCA T ACAACCTACTACCTCA	-5	4303
let 7-d	ACTAT G CAACCTACTACCT C T	-6	6798
let 7-e	ACTATACAACCT C CTACCTCA	-7	3989
let 7-f	AACTATACA A TCTACTACCTCA	-3	6822
let 7-g	ACT G TACAA A CTACTACCTCA	-8	2319
let 7-i	AG CACAA A CTACTACCTCA	-6	2111

* Konsensus-Sequenz

B

	miRNA	Sequenz	Fluoreszenzsignal
PM	miR-19b	UGUGCAA <u>A</u> UCCAUGCAA <u>A</u> ACUGA	2200
MM1	miR-19b+1	UGUGCAA <u>A</u> U <u>U</u> CAUGCAA <u>A</u> ACUGA	350
MM2	miR-19b+2	UGUGCAA <u>A</u> U <u>U</u> CAUGCA <u>G</u> AACUGA	290
MM3	miR-19b+3	UGUGCAA <u>A</u> U <u>U</u> CAUGCA <u>G</u> AACUG <u>G</u>	300

Abb. 3.2: Hybridisierungsergebnisse für miRNAs der let-7-Familie sowie miR-19 Basenaustausche.

A) Expressionsprofil der sehr homologen miRNAs der let-7-Familie im Vergleich zwischen der Hybridisierung auf den miRNA und den Klonierungsfrequenzen. B) Diskriminierung zwischen *Perfect Match* (PM)- und *Mismatch* (MM)- miRNA-Sonden während der Hybridisierung mit dem miRNA-Chip. Hybridisiert wurde jeweils 1 µg *small RNA Fraction* der humanen Zelllinie HeLa.

Wie in Abb. 3.2A deutlich wird, besteht die let-7 miRNA-Familie aus acht Mitgliedern, deren Sequenzen sehr homolog zueinander sind. Teilweise handelt es sich nur um einzelne Basenaustausche, wie der Vergleich zwischen let-7a und let-7e/let-7f zeigt. Korrelierend zu den Frequenzen der klonierten miRNAs in der Tuschl-Datenbank (Landgraf et al., 2007) konnte eine starke Expression von let-7a und -7b, jedoch eine schwächere Expression der anderen let-7-Mitglieder gemessen werden. Die Tatsache, dass einzelne Basenaustausche mit diesem miRNA-Microarray detektiert werden können, wurden durch die in Abb. 3.2B dargestellten Daten bestätigt. Neben der Originalsequenz für miR-19b (PM; *Perfect Match*) wurden auch sogenannte *Mismatch*-Sonden (MM), bei denen einzelne Nukleotidaustausche vorgenommen wurden, auf dem miRNA-Chip immobilisiert. Wie anhand der dargestellten Hybridisierungsergebnisse deutlich wird, führt schon der Austausch eines einzelnen Nukleotids zu einem Hybridisierungsausfall (MM1). Für alle drei MM-Oligonukleotide wurden keine Fluoreszenzsignale, die über dem Hintergrund liegen, detektiert. Diese Daten spiegeln somit eine hohe Spezifität des miRNA-Arrays wieder.

3.1.3 Analyse der miRNA-Expression in hämatopoietischen Zellen unter Verwendung der Microarray-Technologie

Nachdem die Etablierung des miRNA-Chips erfolgt war und unter Verwendung humaner Zelllinien befriedigende Ergebnisse geliefert hatte (Kapitel 3.1.1 und 3.1.2), wurden im folgenden die beschriebenen Hybridisierungsbedingungen auch für die Untersuchung primärer Blutzellen angewandt. Dazu wurden CD56-positive NK-Zellen mittels MACS-Technologie (Kap. 2.3.10.7) angereichert und die miRNA enthaltende *small RNA Fraction* isoliert (miRvana-Kit, siehe Kap. 2.11.1.2). Von dieser RNA wurden jeweils 0,5 µg pro Fluoreszenz in die Markierungsreaktion eingesetzt und diese Proben parallel auf demselben Chip hybridisiert. Wie anhand der in Abb. 3.3 dargestellten Scatterplots deutlich wird, korrelieren die Fluoreszenzsignale der Cy3- und Cy5-markierten Proben für NK-Zellen nicht sehr gut. Entgegen der Erwartung, dass die Signale aufgrund des selben Ausgangsmaterial alle auf einer Geraden liegen müssen, waren hier die Hybridisierungssignale alle in Richtung des Cy5-Kanals verschoben. Ausserdem wurden für beide Markierungen Signale gemessen, die nicht dieselbe Hybridisierungsstärke im jeweils anderen Fluoreszenzkanal aufwiesen. Würden diese Ergebnisse in einem Ansatz mit zwei verschiedenen Proben erzielt werden, würden diese als differentiell exprimierte miRNAs angesehen werden.

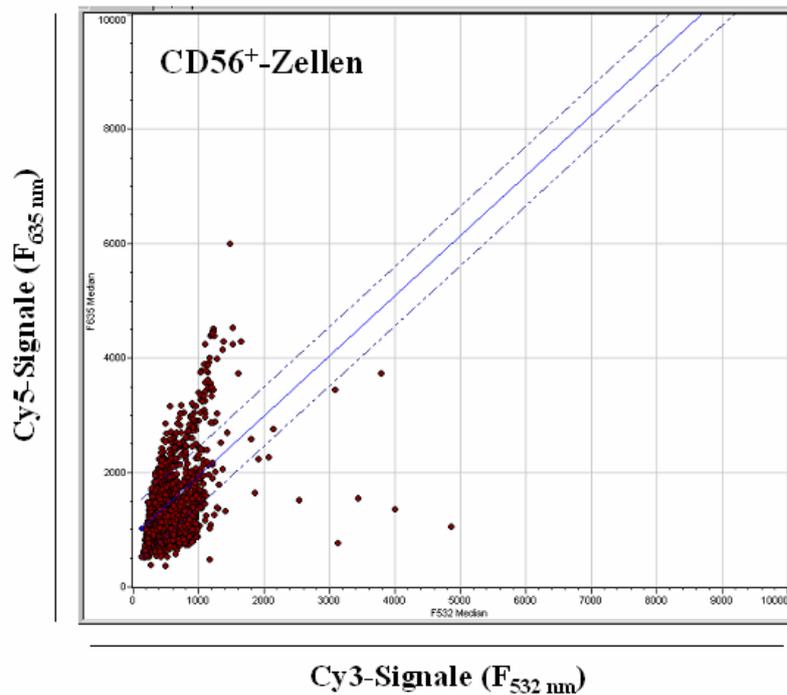


Abb. 3.3: Scatterplot der Zweifarben-Hybridisierung des miRNA-Microarrays mit RNA aus CD56⁺ NK-Zellen. Jeweils 500 ng derselben *small RNA Fraction* wurden mit Cy3- bzw. Cy5-Fluoreszenzfarbstoffen markiert und parallel auf dem miRNA-Chip hybridisiert.

Die Differenz zwischen den mit kultivierten und primären Zellen erzielten Ergebnissen kann aus der Menge des verwendeten miRNA-Materials resultieren. Im Rahmen der Etablierung des miRNA-Chips stellte sich eine RNA-Menge von 1 µg der angereicherten *small RNA Fraction* als optimal heraus. Die Gewinnung dieser Ausgangsmenge ist für Experimente mit Zelllinien kein Problem, bei einem experimentellen Ansatz mit frischen Zellen jedoch schwierig. Für die Gewinnung von 1 µg *small RNA Fraction* mussten mindestens 5 Millionen primäre Zellen sortiert werden. Da die miRNA-Expression hämatopoietischer Zellpopulationen untersucht werden sollte, erwies es sich besonders für die mit einer schwachen Frequenz in Blut vorhandenen Stammzellpopulationen als schwierig, genug Material zu sammeln. Bei der Verwendung von weniger Ausgangsmaterial war der miRNA-Microarray jedoch nicht sensitiv genug.

Deshalb musste für den weiteren Verlauf der Arbeit eine Methode gefunden werden, die neben dem Einsatz geringer Zellmengen eine sensitive Analyse der miRNA-Signatur in verschiedenen hämatopoietischen Zellpopulationen ermöglichte.

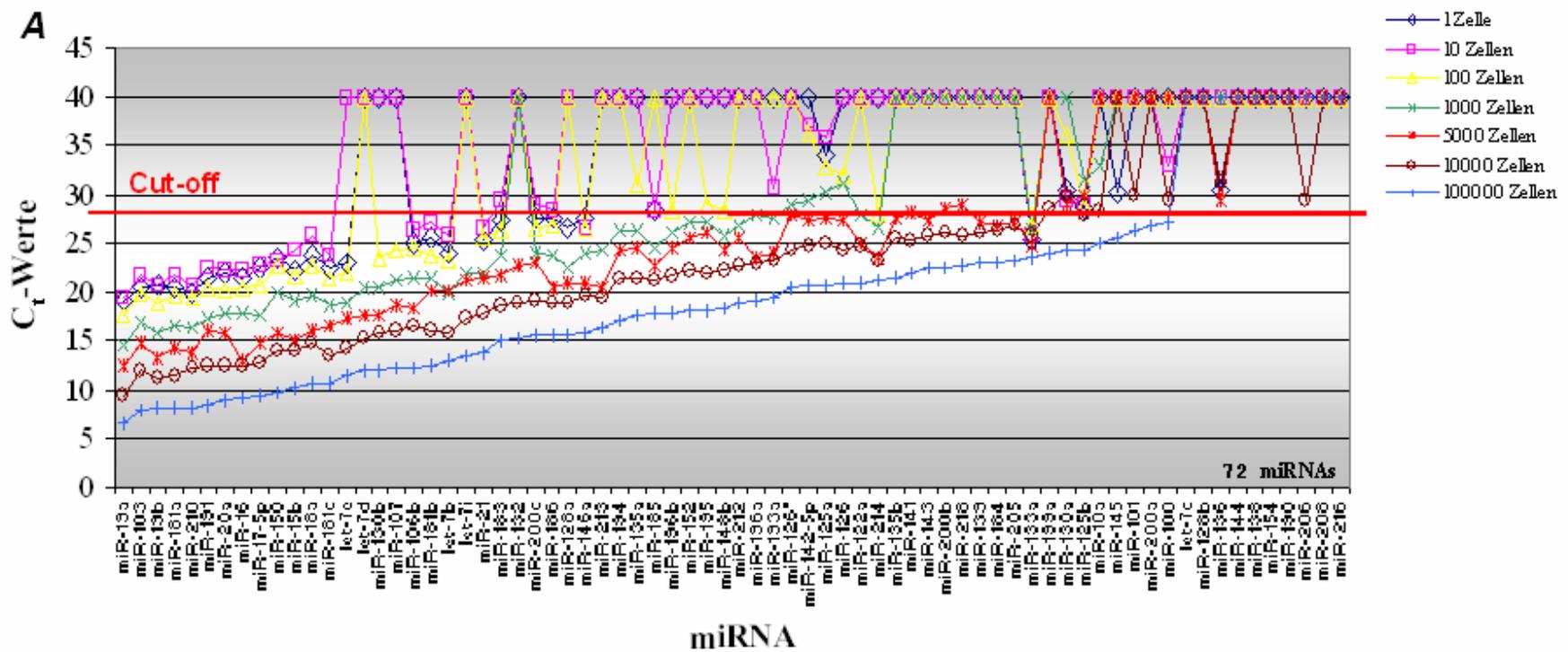
3.2 Etablierung des 330-miRNA-Multiplex PCR-Assays

Wie die vorherigen Ergebnisse gezeigt haben (Kapitel 3.1.3), gab es technische Probleme bei der Analyse der miRNA-Expression in primären, hämatopoietischen Zellen. Die Hybridisierungsergebnisse des miRNA-Chips bei der Untersuchung kleiner Zellmengen waren unzureichend, so dass nach einer anderen, sensitiveren Methode des Expressionsnachweises gesucht werden musste.

Der 330-miRNA-Multiplex PCR-Assay (im folgenden 330-Multiplex-Assay genannt) ermöglicht die miRNA-Expressionsanalyse in kleinsten Zellmengen. Der Assay basiert auf der Methode von Chen et al. (2005), in der die miRNA-Profile in Einzelreaktionen gemessen wurde; d.h. pro experimentellen Ansatz wurde ein Primer eingesetzt. Kürzlich wurden Daten unter Verwendung eines Prototyps dieses Assays, bestehend aus 220 miRNA-spezifischen Primern, veröffentlicht (Tang et al., 2006). In einer Kooperation mit der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) wurde uns der kommerziell nicht erhältliche 330-Multiplex-Assay zur Verfügung gestellt und die Anwendung dieser Methode für die miRNA-Expressionsanalyse von frischen hämatopoietischen Zellen getestet und optimiert. Im Rahmen der Etablierungsarbeit wurde untersucht, ob diese Methode aufgrund der direkten Lyse der Zellen eine Untersuchung von minimalsten Zellzahlen bis hin zu nur einer Zelle pro Reaktionsansatz erlaubt.

3.2.1 Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit des 330-Multiplex-Assay

Um die für die Fragestellung der miRNA-Expressionsprofile in verschiedenen humanen Zelltypen der Hämatopoiese optimale Zellzahl zu ermitteln, wurde zunächst eine Konzentrationsreihe mit Zellen der humanen T-Zell-Linie Jurkat durchgeführt. Dafür wurden mittels serieller Verdünnung die Zellzahlmengen 100000, 10000, 5000, 1000, 100, 10 Zellen und 1 Zelle hergestellt, gemäß dem Protokoll (Kap. 2.11.7.1) in 330-Multiplex-Ansätzen in cDNA umgeschrieben, amplifiziert und abschließend die Expressionsstärken in der Real-Time PCR ermittelt. In Abb. 3.4 sind die Ergebnisse dieses Vorversuches graphisch dargestellt. Auf der x-Achse wurden die untersuchten 72 verschiedenen miRNAs aufgetragen, während die y-Achse die Fluoreszenzsignalwerte enthält. Diese ermittelten Signale sind als Rohdaten (Ct-Werte) dargestellt; d.h. es handelt sich um unnormalisierte Daten.



Vergleich aufgetragen nach ansteigenden C_t -Werten der Probe „100000 Zellen“

B

<i>eingesetzte Zellzahl</i>	1	10	100	1000	5000	10000	100000
<i># messbarer miRNAs < 28</i>	24	19	26	41	51	55	62

Abb. 3.4: Messung der miRNA-Expression in unterschiedlichen Zellzahlmengen der humanen T-Zell-Linie Jurkat. (Seite 63) A) Unnormalisierte Fluoreszenzwerte (Ct-Werte) von 72 verschiedenen miRNAs wurden in Richtung der Abnahme der Expressionsstärke für die Probe „100000 Zellen“ aufgetragen. Dabei repräsentiert ein geringer Ct-Wert eine starke Genexpression, während ein hoher Ct-Wert eine geringe bzw. keine Expression des entsprechenden miRNA-Gens wiedergibt. Der in rot eingezeichnete Cut-off markiert den Ct-Wert, welcher als Schwellenwert eine Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen Signalen erlaubt. B) Anzahl der messbaren miRNAs für jede analysierte Zellkonzentration, welche einen Ct-Wert kleiner 28 besitzen und damit als spezifisch exprimiert anzusehenden sind.

Die miRNAs sind nach zunehmendem Ct-Werten der Probe „100000 Jurkat-Zellen“ sortiert, so dass der Verlauf der Kurven einer Expressionsabnahme von links nach rechts entspricht. Es ist zu betonen, dass zwischen der Höhe des Ct-Wertes und der Expressionsstärke des entsprechenden Gens ein reziprokes Verhältnis besteht; ein niedriger Ct-Wert bedeutet eine hohe Expressionsstärke, während ein hoher Ct-Wert eine schwache Expression widerspiegelt. Wie in Abb. 3.4A dargestellt, ergibt sich bei dieser Form der Auftragung mit zunehmender Zellzahl ein zunehmend linearer Verlauf. Die Kurven der einzelnen Zellmengen sind gemäß den Erwartungen mit abnehmender Zellzahl in Richtung geringerer Expressionsstärke (höherer Ct-Wert) verschoben. Vergleichbare Ergebnisse konnten erst ab einer Zellzahl von 5000 Zellen erzielt werden. Dies korreliert mit dem Kurvenverlauf, wo eine Linearität erst ab einer Zellzahl von 1000 Zellen beobachtet werden kann.

Der Vergleich der unterschiedlichen Zellmengen als Ausgangsmaterial zeigt auch, dass höhere Zellzahlen ein breiteres Spektrum an detektierbaren miRNAs aufweisen als eine geringere Zellmenge. Bei der Verwendung von 1 bis 100 Zellen konnten viele miRNAs aufgrund ihrer geringen Transkriptmenge nicht nachgewiesen werden, während der Einsatz von 5000 und mehr Zellen einen deutlichen Nachweis erbrachte. Dies wird in Abbildung 3.4B durch die Anzahl der messbaren miRNAs verdeutlicht.

Messbare miRNAs sind solche miRNA-Gene, deren Transkriptmenge unter dem gewählten Schwellenwert von einem Ct-Wert von 28 liegt (*Cut-off* genannt). Dieser muss gesetzt werden, da mit zunehmender PCR-Reaktionsdauer unspezifische Signale erhalten werden können. Bei Standard-Real-Time PCRs unter Verwendung von messengerRNA-Transkripten (mRNA) zur Ermittlung der Expressionsstärke wird dieser Schwellenwert bei einem Ct-Wert von 35 gesetzt. Da es sich bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methode allerdings um die Analyse von miRNA-Transkripten handelt, die im Anschluss an die Reverse Transkription in einem zusätzlichen PCR-Schritt vermehrt wurden (siehe Abb. 2.2, 3. Schritt), muss der Schwellenwert bei einem niedrigeren Ct-Wert gesetzt werden. Für diese Fragestellung wurde der von der Firma Applied Biosystems empfohlene Ct-Wert von 28 gewählt. Dies bedeutet, dass Ct-Werte, die kleiner 28 sind und unter diesem Signalwert

liegen, als spezifische und auswertbare Datenpunkte angesehen werden konnten, während miRNAs mit einem Ct-Wert über diesem Schwellenwert als unspezifische Signale gewertet und in den weiterführenden Analysen als nicht messbar behandelt wurden.

Mit einem *Cut-off* von 28 wurde folgendes Ergebnis erzielt. In Proben, die eine Ausgangszellzahl von 1 Zelle, 10 Zellen bzw. 100 Zellen hatten, konnte in etwa ein Drittel der miRNAs detektiert werden (siehe Abb. 3.4B), was durch die erhöhte Anzahl an Ausfällen deutlich wird, die bei einem Ct-Wert von 40 liegen. Im Gegensatz dazu konnten in den Ansätzen, die mit 1000 Zellzahlen durchgeführt wurden, 2/3 der exprimierten miRNAs gemessen werden. Die Unterschiede in der Zahl der detektierten miRNAs zwischen 51 miRNAs bei 5000 Zellen zu 55 messbaren miRNAs bei 10000 Zellen und 62 miRNAs bei 100000 Zellen sind geringer und betreffen nur noch solche miRNAs, die offensichtlich sehr schwach exprimiert werden. Alle miRNAs, die bei 100000 Zellen einen Ct-Wert kleiner 24 hatten, waren auch bei 5000 und 10000 Zellen messbar. Die vergleichende Darstellung der miRNA-Expressionsprofile von Jurkat-Zellen in Abhängigkeit der eingesetzten Zellzahl verdeutlicht, dass bei der Analyse von 1 bis 100 Zellen nur die stark exprimierten miRNA-Transkripte detektiert werden können. Dies ist in der folgenden Abbildung nochmals hervorgehoben.

In Abb. 3.5 wurden die Expressionssignale in 4 Quantile eingeteilt. Quantil 1 beinhaltet stark exprimierte miRNA-Transkripte, während im zweiten Quantil miRNAs mit einer mittleren Expressionsstärke einsortiert sind. Im dritten Quantil wiederum finden sich die schwach messbaren miRNAs wieder, während Quantil 4 alle nicht messbaren miRNAs enthält. Exemplarisch sind die Expressionsprofile von 10, 1000 und 100000 Jurkat-Zellen nach zunehmenden Ct-Werten der Probe „100000 Zellen“ aufgetragen.

Für 100000 Zellen konnten 22 miRNAs mit einer starken Expression nachgewiesen werden und sind deshalb in Quantil 1 einsortiert. Für 1000 Zellen sind nur noch 16 dieser miRNAs in diesem Bereich, während die restlichen sechs miRNAs aufgrund der schwächeren Expression in Quantil 2 eingeordnet sind. Für den Reaktionsansatz, bestehend aus zehn Zellen, konnten nur elf der 22 in 100000 Zellansatz gemessenen miRNAs mit einer starken Expression detektiert werden. Die anderen elf waren im mittleren bzw. schwachen Expressionsbereich (*low-level*) angesiedelt.

Während in Quantil 2 noch 13 miRNAs für 100000 Zellen mit einem mittleren Expressionslevel detektiert werden konnten, sind diese miRNAs für 1000 Zellen schon im schwachen Expressionsbereich angesiedelt. Für 10 Zellen konnten noch zwei dieser miRNAs detektiert werden, während für die anderen 11 Transkripte kein Fluoreszenzsignal messbar

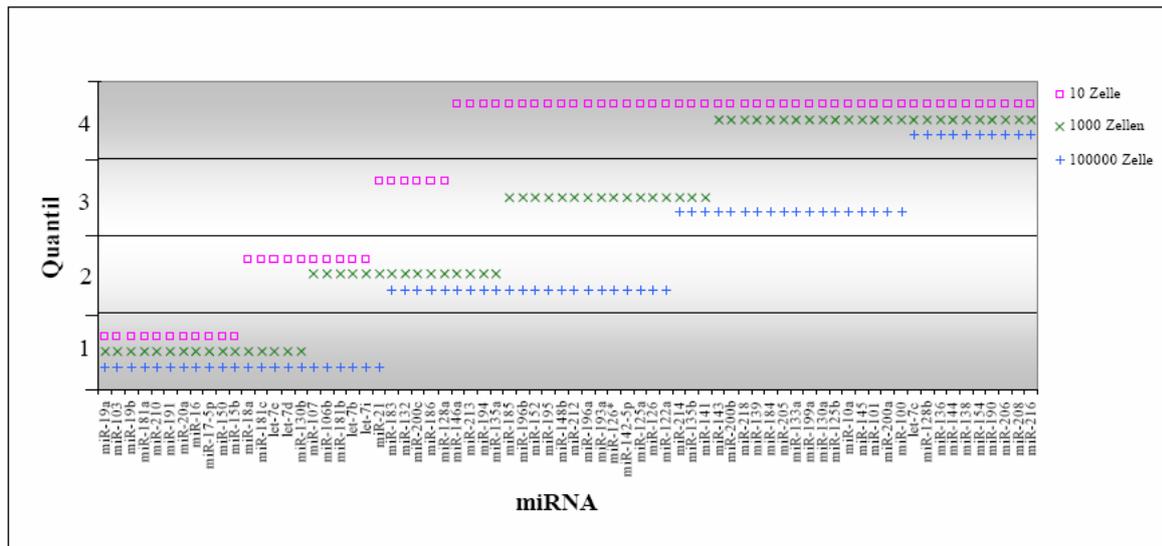


Abb. 3.5: Einteilung der miRNA-Expressionswerte für verschiedene Konzentrationen an Jurkatzellen in Quantile. Die ermittelten Expressionssignale (Ct-Werte) wurden entsprechend ihrer Höhe in vier verschiedene Quantile eingeteilt, die einer starken (Quantil 1), mittleren (Quantil 2), schwachen (Quantil 3) und keiner Expression (Quantil 4) entsprechen.

war. Für geringere Zellmengen bis runter auf Einzelzellniveau waren diese miRNAs nicht detektierbar. Zusätzlich war die Reproduzierbarkeit bei der Verwendung von einer Zelle deutlich geringer (50%, Daten nicht gezeigt).

Genau betrachtet ist die Vorgehensweise eines einheitlichen Schwellenwertes unabhängig von der eingesetzten Zellzahl nicht ganz korrekt, da ein für jeden Reaktionsansatz gleicher Schwellenwert falsch-negative Ergebnisse erzeugt. Dies kann anhand der folgenden Abb. 3.6 gezeigt werden. In den Diagrammen ist die Abnahme der Signalstärken der miRNAs für die Reaktionsansätze `1 Zelle`, `1000 Zellen`, `5000 Zellen` und `10000 Zellen` aufgetragen. Man erkennt den für diese Art der Auftragung typischen Kurvenverlauf. Die Signalstärke nimmt linear ab und erreicht in Abhängigkeit der eingesetzten Zellzahl einen Schwellenwert, an dem schwach exprimierte sowie nicht exprimierte Transkripte nicht detektierbar sind. An diesem Punkt knickt der lineare Kurvenverlauf ab und geht in eine Plateauphase über, da diese Werte einen Ct-Wert von 40 aufweisen. Wie die vier Diagramme in Abb. 3.6A darlegen, liegt dieser Abknickpunkt für jede Zellzahl bei einem anderen Ct-Wert.

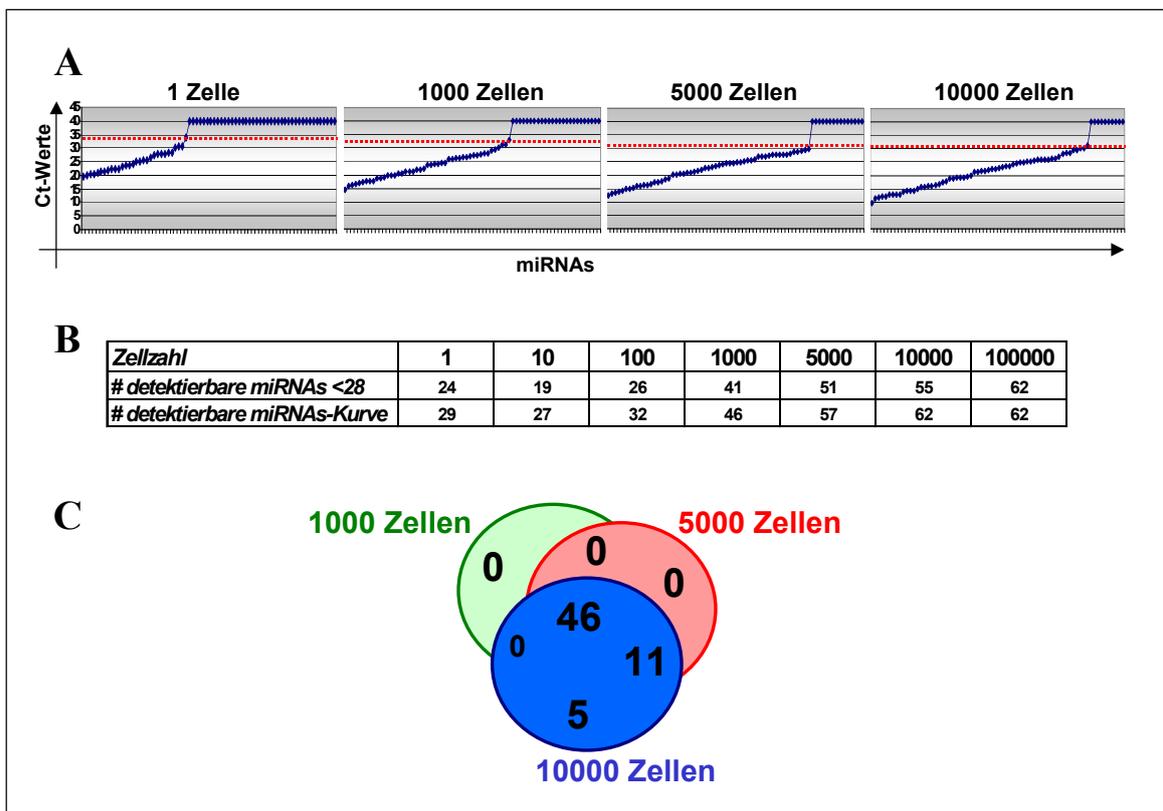


Abb. 3.6: Messung der miRNA-Expression in unterschiedlichen Zellzahlmengen der humanen T-Zell-Linie Jurkat A) Unnormalisierte Fluoreszenzwerte (Ct-Werte) von 72 verschiedenen miRNAs wurden in Richtung der Abnahme der Expressionsstärke für jede Probe getrennt aufgetragen. Dabei repräsentiert ein geringer Ct-Wert eine starke Genexpression, während ein hoher Ct-Wert eine geringe bzw. keine Expression des entsprechenden miRNA-Gens wiedergibt. Die rote gepunktete Linie zeigt den Ct-Wert an, an dem die Kurve den linearen Bereich verlässt und der als Schwellenwert genommen wurde. B) Vergleich der Anzahl detektierbarer miRNAs mit einem für alle Reaktionen einheitlichem Schwellenwert von 28 und einem Zellzahl-abhängigen Cut-Off-Wert. C) Venndiagramm, welches die Übereinstimmung der exprimierten miRNAs zwischen 1000, 5000 und 10000 Zellen wiedergibt. In die Korrelationsberechnung wurden nur die exprimierten miRNAs einbezogen (46 für 1000 Zellen, 57 für 5000 Zellen und 62 miRNAs für 10000 Zellen).

Bei der Verwendung von einer Zelle erfolgte der Übergang von Linearität zur Plateauphase bei einem Ct-Wert von 34, der bei der Verwendung von 1000 Zellen schon auf einen Ct von 32 erniedrigt war. Experimente unter Verwendung von sowohl 5000 als auch 10000 Zellen zeigten den Abbruch des linearen Kurvenverlaufs bei einem Ct von 31.

Um zu untersuchen, ob dieser Abknickpunkt als der Ct-Wert gewertet werden kann, an dem die Trennung exprimierter und somit detektierbarer miRNA-Transkripte von nicht exprimierten miRNAs erfolgen kann, wurde die Anzahl an messbaren miRNAs für die einzelnen Verdünnungsstufen sowie die Übereinstimmung der gemessenen miRNA-Transkripte ermittelt und in Abb. 3.6B und 3.6C dargestellt.

Korrelierend zu den voran gegangenen Abbildungen wird auch in dieser Abbildung deutlich, dass das Spektrum der messbaren miRNAs für geringe Zellzahlen schmaler ist als das für höhere Zellzahlen. Dieses enge Spektrum geht einher mit höheren Ct-Werten, also geringeren miRNA-Transkriptmengen. Bei der Analyse unter Verwendung von einzelnen Zellen als Ausgangsmaterial konnten 29 miRNAs detektiert werden, die in einem Bereich von 20 bis 34 Ct's lagen. Für die 1000-fache Menge an eingesetzten Jurkatzellen konnten 46 miRNAs bestimmt werden, deren Ct-Werte zwischen 14 und 32 lokalisiert waren. Bei 5000 eingesetzten Zellen spreizte sich der messbare Bereich gemäss den Erwartungen noch weiter auf; 57 miRNAs waren messbar mit Ct-Werten von 12 bis 31. Die Zunahme an messbaren miRNAs erreichte mit dem Einsatz von 10000 Zellen eine Sättigung. Mit dieser Zellkonzentration konnte dieselbe Anzahl und die gleichen miRNAs detektiert werden, wie unter Verwendung von 100000 Zellen ermittelt wurden (Abb. 3.6B). Betrachtet man das in Abb. 3.6C dargestellte Venndiagramm, für das nur die exprimierten miRNAs (Ct-Wert kleiner als der Schwellenwert) in die Kalkulation mit einbezogen wurden, so wird deutlich, dass 57 der 62 detektierbaren miRNAs übereinstimmend in den Proben `5000 Zellen` und `10000 Zellen` gemessen werden konnten. Fünf miRNAs waren ausschließlich bei der höheren Zellausgangsmenge messbar. Analysiert man für diese fünf miRNAs den Kurvenverlauf der Real-Time PCR, stellt man fest, dass zwei dieser fünf miRNAs keinen exponentiellen Anstieg der Kurve in der Real-Time-PCR aufwiesen und so als unspezifische Signale aus der weiteren Analyse herausgenommen werden mussten. Dieses Ergebnis spiegelt das generelle Problem der semi-quantitativen Real-Time PCR-Technologie wieder. Eine größere Menge an Ausgangsmaterial ermöglicht zwar eine höhere Sensitivität, erhöht aber gleichzeitig auch die Gefahr, falsch-positiv Signale zu erhalten.

Zusammenfassend kann hiermit festgestellt werden, dass der Übergang von der Linearität zur Plateauphase der Kurve als geeigneter Indikator zur Bestimmung des Schwellenwertes genutzt werden kann. Somit kann anhand dieser Art der graphischen Darstellung der Ct-Wert ermittelt werden, bei dem der *Cut-off* des jeweiligen Reaktionsansatzes gesetzt werden muss. Angesichts des sehr limitierten Materials bei der Verwendung der hämatopoietischen Zelltypen erschien eine Zellzahl von 5000 Zellen als optimal. Diese Zellzahl stellt einen vertretbaren Kompromiss zwischen einer geringen Zellzahl, bei der alle miRNAs gemessen werden können und der nötigen Spezifität, bei der keine falsch-positiven Signale detektiert werden, her.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten primären Zellen des hämatopoietischen Systems handelt es sich jedoch im Gegensatz zu kultivierten Zellen zum grössten Teil um ruhende, nicht stimulierte Zellen. Um sicherzustellen, dass dieser experimentelle Ansatz auch für frisch isolierte, hämatopoietische Zellen optimal ist, wurden NK-Zellen aus peripherem Blut isoliert und die miRNA-Expressionsprofile für alle 330 miRNAs unter Verwendung von 1000 bzw. 5000 frischen NK-Zellen des selben Spenders in Replikaten bestimmt. Die Ergebnisse dieses Vergleichs sind in Abb. 3.7 dargestellt. Wiederum wurden die ermittelten Expressionswerte in der Reihenfolge der zunehmenden Ct-Werte sortiert; in diesem Fall vergleichend zur Probe '5000 Zellen'. Auch in dieser Abbildung wird deutlich, dass die Kurven parallel verlaufen und gemäss der Erwartung die Expressionsstärke für die 1000-Zell-Reaktion geringer ausfiel (Abb. 3.7A). Dies konnte durch eine Differenz in den PCR von etwa drei Zyklen bestätigt werden.

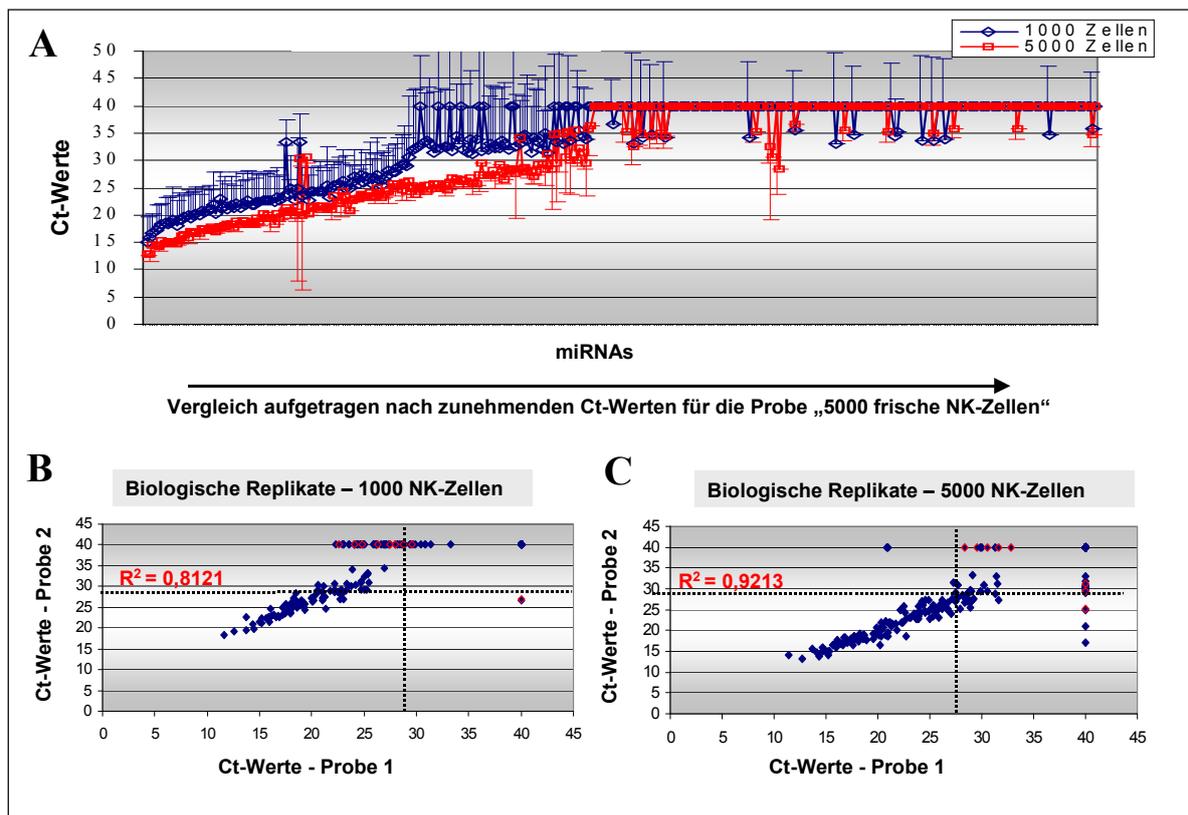


Abb. 3.7: Messung der miRNA-Expression in primären NK-Zellen unter Verwendung von 1000 bzw. 5000 Zellen als Ausgangsmaterial. A) Darstellung der im Replikat gemessenen miRNA-Expression für 1000 (blau) bzw. 5000 (rot) frische NK-Zellen inklusive Standardabweichung. Die unnormalisierten Datenpunkte wurden entsprechend der Expressionsabnahme der Probe „5000 NK-Zellen“ aufgetragen. B) Scatterplot-Darstellung der als biologische Replikate gemessenen Expressionsstärken von 330 miRNAs für 1000 NK-Zellen (links) oder 5000 NK-Zellen (rechts). Die gepunkteten Linien stellen die Grenze zwischen messbaren und nicht detektierbaren miRNA-Signalen dar. Der obere rechte Quadrant ist die sogenannte Grauzone, in denen gemessene Datenpunkte als unspezifische Fluoreszenzsignale gewertet wurden.

Sowohl in Abb. 3.7A als auch in den Streudiagramm-Darstellungen (Scatterplot, Abbildung 3.7B und 3.7C), in denen die biologischen Replikate für die jeweilige Zellmenge gegeneinander aufgetragen wurden, wird deutlich, dass die Varianz der ermittelten Profile bei der Benutzung von 1000 NK-Zellen als Ausgangsmaterial viel größer war als beim Einsatz von 5000 frischen NK-Zellen. Dies wird besonders durch die Vielzahl an Ausfällen in der 1000-Zell-Probe deutlich. Betrachtet man die Scatterplots, bei denen 5000 NK-Zellen gegeneinander verglichen wurden, die vom selben Spender stammen, jedoch an verschiedenen Tagen isoliert wurden, so ist es offensichtlich, dass es sich bei den Differenzen meist um schwach exprimierte miRNAs handelt, die oberhalb des Schwellenwertes liegen. Die Anzahl der Ausfälle betrug nur fünf Stück (Abb. 3.7C, Quadrant A und C, rot markiert). Im Gegensatz dazu befinden sich die Ausfälle für 1000 NK-Zellen zum großen Teil nicht oberhalb des Schwellenwertes, sondern im Bereich der schwach exprimierten Gene, so dass die Transkripte dieser miRNA-Gene in der einen Probe detektiert werden konnten (Probe 1), während dies in der Vergleichsprobe (Probe 2) nicht der Fall war. Dies sowie die höhere Reproduzierbarkeit ($R^2 = 92\%$ bei 5000 Zellen gegen 81% beim Einsatz von 1000 frisch isolierten NK-Zellen) untermauerten den Entschluss, die miRNA-Genexpression im Verlauf der Hämatopoese unter Verwendung von 5000 Zellen als Ausgangsmaterial zu analysieren.

Die hohe Reproduzierbarkeit des 330-Multiplex-Assays konnte neben den oben gezeigten biologischen Replikaten (Abb. 3.7) auch für technische Wiederholungen gezeigt werden. In der Abb. 3.8A und 3.8B sind zwei unabhängige TaqMan-PCR-Experimente derselben Probe unter Verwendung von 5000 NK-Zellen dargestellt. Während in Abbildungsteil A die ermittelten Fluoreszenzsignalstärken für die einzelnen miRNAs als Ct-Werte in Abhängigkeit von der Position auf der PCR-Platte dargestellt sind, zeigt Abbildung 3.8B den Vergleich der Daten als Scatterplot. Anhand des eingetragenen Korrelationskoeffizienten ist die Übereinstimmung der Datenpunkte angezeigt, die bei $97,2\%$ liegt.

Um zu überprüfen, ob die verschiedenen Primerkombinationen unspezifische Amplifikationsreaktionen verursachen, wie z.B. durch Bildung von Primer-Dimer-Produkten, wurde ein Reaktionsansatz ohne RNA-Material (*no template control*, NTC) mitgeführt. In keiner der 330 verschiedenen Reaktionen konnte ein Signal gemessen werden, das unterhalb des gewählten Schwellenwertes von 28 lag (Abb. 3.8C).

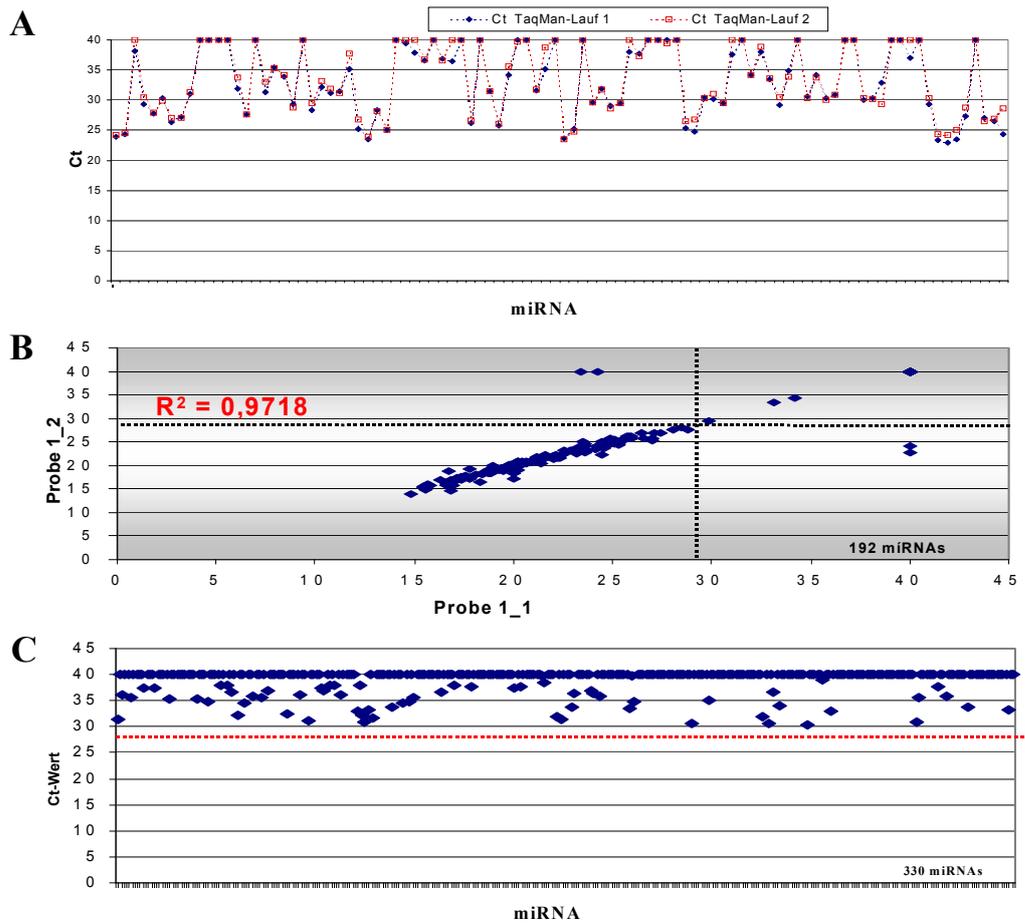


Abb. 3.8: Reproduzierbarkeit und Spezifität des 330-Multiplex-assays. Darstellung der miRNA-Expression für technische Replikate von 5000 frischen NK-Zellen als unnormalisierten Datenpunkte in einer Fieberkurve (A) und im Streudiagramm (B). Der eingezeichnete Korrelationskoeffizient R^2 gibt die Übereinstimmung wieder. C) Darstellung der gemessenen Fluoreszenzsignale für die Wasserkontrolle (kein RNA-Material).

3.2.2 Spezifität des 330-Multiplex PCR-Assays

Die in Kapitel 3.2.1 dargestellten Ergebnisse deuten auf eine hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Methode hin. Um die Spezifität des 330-Multiplex-Assay näher zu untersuchen, wurden die Daten unter Verwendung anderer Methoden verifiziert. Dazu wurde neben eine weiteren PCR-basierenden miRNA-Nachweismethode unter Verwendung des „*Human miRNA profiling early access kits*“ der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA), die im folgenden als Einzel-PCR-Assay bezeichnet wird, die Northern Blot-Technologie angewandt. Die generierten Datensets wurden anschließend mit Daten aus der Literatur verglichen (Landgraf et al., 2007; Nelson et al., 2004). In der Arbeit von Nelson wurden die Expressionsprofile von HeLa- und Jurkat-Zellen mittels der miRNA-Microarray-

Technologie ermittelt, während die Gruppe von Prof. Tuschl an der Rockefeller University (New York City, USA) eine Klonierungsmethode zur miRNA-Sequenzierungsanalyse etabliert und Expressionsdaten für diverse Zelltypen in der genannten Arbeit publiziert hat. Dank der Kooperation von Prof. Tuschl mit unserem Institut konnten wir auf die damals nicht öffentliche Datenbank zugreifen und die im folgenden dargestellten vergleichenden Analysen durchführen.

Wie bereits im Material und Methodenteil näher erklärt (Kap. 2.11.7.2), unterscheidet sich der Einzel-PCR-Assay vom 330-Multiplex PCR-Assay in folgenden Punkten. Das eingesetzte Material für den Einzel-PCR-Assay ist die mittels Phenol-Chloroform isolierte sogenannte *small RNA Fraction*, welche neben den Vorläufer-miRNA- (pre-miRNAs) und anderen RNA-Molekülen auch die reifen miRNA-Transkripte enthält. Letztere werden bei dieser Methode individuell in einer Einzelreaktion umgeschrieben, da sich nur ein miRNA-spezifischer Primer in jedem Reaktionsansatz befindet.

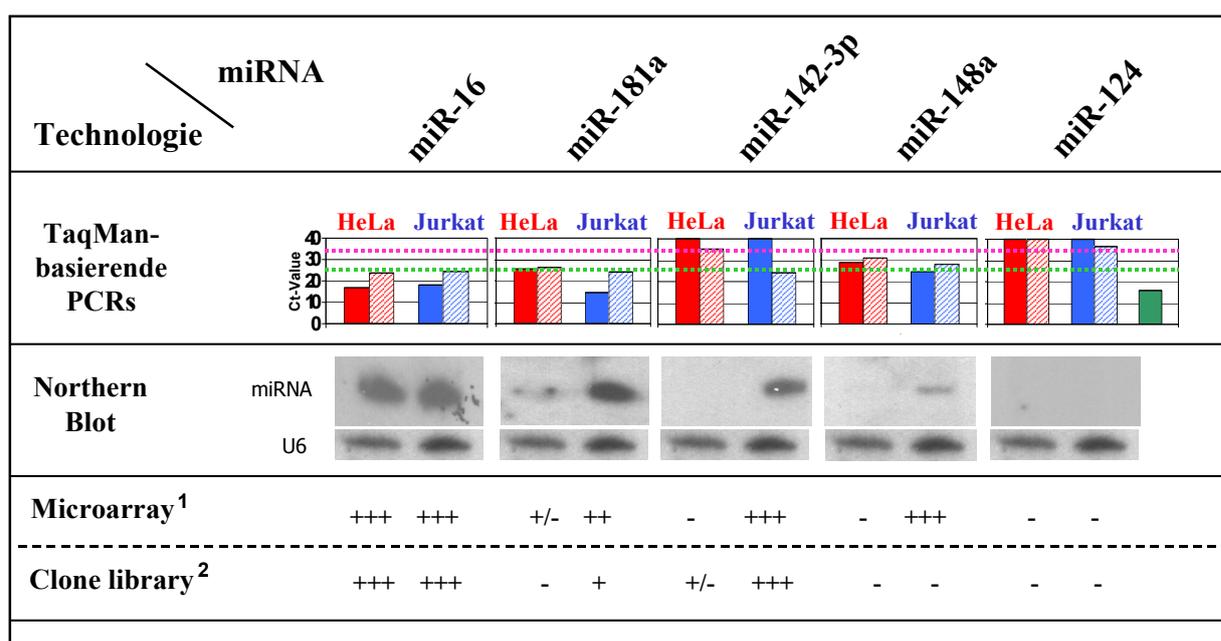
Als Material für den 330-Multiplex-Assay dienten frische Zellen, deren Lyse durch einen Hitzeschritt erfolgte. Die dabei freigesetzten miRNAs wurden anschließend in einer einzigen, aus einem Gemisch mit 330 verschiedenen miRNA-spezifischen Primern bestehenden Reaktion in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben.

Ein weiterer Unterschied des Einzel-PCR-Assays ist, dass kein Amplifikationsschritt zwischen der Reversen Transkription und der TaqMan-basierenden Real-Time PCR durchgeführt wird, da im Vergleich zum 330-Multiplex-Assay mehr Ausgangsmaterial eingesetzt wird. Dies führt zu einer Verschiebung der Ct-Werte; durch den direkten Einsatz der umgeschriebenen miRNA erfolgt eine spätere Detektion der gemessenen Transkripte, was in einem höheren Ct-Wert resultiert. Somit muss beachtet werden, dass der Schwellenwert (*Cut-off*) bei dieser Methode bei einem Ct-Wert von 35 liegt.

Der Vergleich der verschiedenen Methoden ist in Abb. 3.9 für ausgewählte miRNAs dargestellt. Die hierbei untersuchten fünf miRNAs wurden anhand ihrer ermittelten unterschiedlichen Expressionsstärken im 330-Multiplex-Assay ausgewählt. Als Ladekontrolle für die Northern-Blot-Analysen wurde eine spezifische Sonde gegen die U6-snRNA (small nuclear RNA) verwendet. Diese RNA-Moleküle sind in Eukaryonten hochkonserviert und in allen Spezies stark exprimiert.

Der Vergleich für miR-16, einer microRNA, die in vielen Veröffentlichungen als housekeeping-Gen beschrieben wird, da dieses Gen in allen bis dato untersuchten Zellpopulationen und Spezies als abundant exprimiert gefunden wurde, zeigt eine gute Übereinstimmung zwischen allen Datensets (Abb. 3.9). In den beiden PCR-basierten

Methoden weist miR-16 eine hohe Expressionsstärke auf (ausgefüllte Balken zeigen die Ct-Werte, die mittels 330-Multiplex-Assay ermittelt wurden, während die offenen Balken die mit dem Einzel-PCR-Assay erlangten Ct-Werte darstellen), die deutlich unter dem durch eine gepunktete Linie dargestellten Schwellenwert liegt (grün gepunktete Linie zeigt den *Cut-off* von 28 für den 330-Multiplex-Assay an, während die rote Linie den Schwellenwert von 35 für den Einzel-PCR-Assay markiert). Die starke Expression in HeLa- sowie Jurkat-Zellen konnte mittels Northern Blot bestätigt werden (Abb. 3.9B) und korreliert auch mit den Daten aus der Microarray- sowie Klonierungsdatenbank (+++ steht für eine starke Expression dieser Gene, Abb. 3.9C und 3.9D). Betrachtet man im folgenden die Ergebnisse für miR-181a, so erkennt man erneut eine gute Übereinstimmung zwischen den unabhängigen Methoden. In HeLa-Zellen konnte mittels den PCR-basierenden Methoden nur eine schwache Expression nachgewiesen werden, die sich sowohl im Northern Blot als auch im Microarray als solche darstellte. Für Zellen der CD4-positiven Jurkat-Zelllinie wurde in allen fünf Methoden dagegen eine erhöhte bis starke Expression von miR-181a nachgewiesen.



¹ Nelson et al., Nature Methods, 2004

² Tuschl Database; Rockefeller University; NY

Abb. 3.9: Verifikation des 330-multiplex-Assays unter Verwendung anderer Methoden. Für die Analyse wurden fünf miRNAs aufgrund ihrer verschiedenen Expressionsstärke im 330-Multiplex PCR-Assay ausgesucht. Die mittels des 330-Multiplex Assays erhaltenen Daten (als Ct-Werte dargestellt, ausgefüllte Balken) wurden u.a. mit dem Einzel-PCR-Assay unter Verwendung der Zervixcarcinomzelllinie HeLa und der T-Zelllinie Jurkat verglichen (gestrichelte Balken). Eine weitere Verifikationsmethode stellte der Northern Blot dar; hierbei wurde die Expression mit miRNA-spezifischen komplementären ³²P-Sonden erzielt. U6-snRNA diente als Kontrolle für eine gleichmässige Beladung der Spuren. Die Korrelation mit publizierten Daten sind ebenfalls dargestellt. Die von den Autoren veröffentlichten Daten sind gemäss ihrer Expressionsstärken mit +++, + oder - dargestellt, wobei +++ für eine hohe Transkriptmenge und - für keine Transkripte steht.

Der Vergleich der Expressionsprofile von miR-148a in HeLa- und Jurkat-Zellen korrelierte ebenfalls mit den publizierten Daten. In HeLa-Zellen konnte in keiner der durchgeführten Analysen die Expression von miR-148a nachgewiesen werden. Für Jurkat-Zellen zeigte sich eine relativ gute Übereinstimmung. In beiden PCR-Methoden konnten schwache Fluoreszenzsignale detektiert werden, die durch eine schwache Banden im Northern-Blot bestätigt wurden (Abb. 3.9A und 3.9B). In der Klonierungsdatenbank konnte keine Expression von miR-148a gefunden werden, was aber an der geringen Anzahl von analysierten Klonen liegen kann. Da in den hochsensitiven PCR-Methoden nur schwache Signale gemessen werden konnten, ist das Ausbleiben eines Ergebnisses in der Clone library somit nicht verwunderlich. Die von Nelson beschriebene starke Expression von miR-148a im Microarrays widerspricht den in unserem Labor generierten Daten. Dies kann an der verwendeten Sonde liegen. Diese ist in den Daten von Nelson nur als miR-148 angegeben und unterscheidet nicht zwischen miR-148a und miR-148b. Das Transkript für miR-148b wurde in den Jurkat-Zellen viel stärker exprimiert als miR-148a (Daten nicht gezeigt), so dass das starke Signal, das in der Publikation von Nelson angegeben ist, auf eine Hybridisierung mit miR-148b zurückzuführen sein kann.

Für miR-124 konnten in allen Methodenansätzen weder für die Zervixkarzinomzellen HeLa noch für die CD4-positiven Jurkat-Zellen Transkripte nachgewiesen werden. Dies ist nicht verwunderlich, da miR-124 als Gehirn-spezifische miRNA von Dostie et al. (Dostie et al., 2003) beschrieben wurde. Dies konnte mit der Analyse neural-differenzierter humaner embryonaler Stammzellen, die freundlicherweise von Prof. Brüstle aus Bonn zur Verfügung gestellt wurden, bestätigt werden. Der in Abb. 3.9A zusätzlich dargestellte grüne Balken zeigt eine starke Expression von miR-124 in diesen Zellen, die mittels 330-Multiplex-Assay nachgewiesen wurde.

Einzig miR-142-3p zeigte bei der Verifikation Unterschiede zwischen den einzelnen Methoden. Die miRNA-142 stellt einen der wenigen Fälle dar, bei dem nicht nur der *guide-strand* (Sense-Strang) zu einem reifen miRNA-Molekül prozessiert wird, sondern die beiden komplementären Sequenzen der Hairpin-Struktur maturiert werden. Wie die Abbildung 3.9A zeigt, konnte bei der Verwendung der Primer im 330-Multiplex PCR-Assay für miR-142-3p kein Produkt, für miR-142-5p (Daten nicht gezeigt) ausschliesslich ein schwaches Produkt gemessen werden. Im Gegensatz dazu war dies bei der Verwendung des Einzel-PCR-Assays kein Problem, wie die schaffierten Balken im Abb. 3.9A für miR-142-3p in Jurkat-Zellen zeigen. Die mit dem Einzel-PCR-Assay erlangten Daten stimmen ebenfalls mit den Vergleichsdaten des Northern Blots sowie der Literaturrecherche überein (Abb. 3.9B bis

3.9D). Untersuchungen zur Ursache der negativen Ergebnisse für miR-142-3p und der schwachen Expressionsstärke für miR-142-5p zeigten Ausfälle von Primern im 330-Multiplex Assay. In den folgenden Untersuchungen wurde miR-142-3p aus der Analyse ausgeschlossen. Für weitergehende Entwicklungen des Multiplex PCR-Assays bei der Firma Applied Biosystems wurde dieses Problem berücksichtigt.

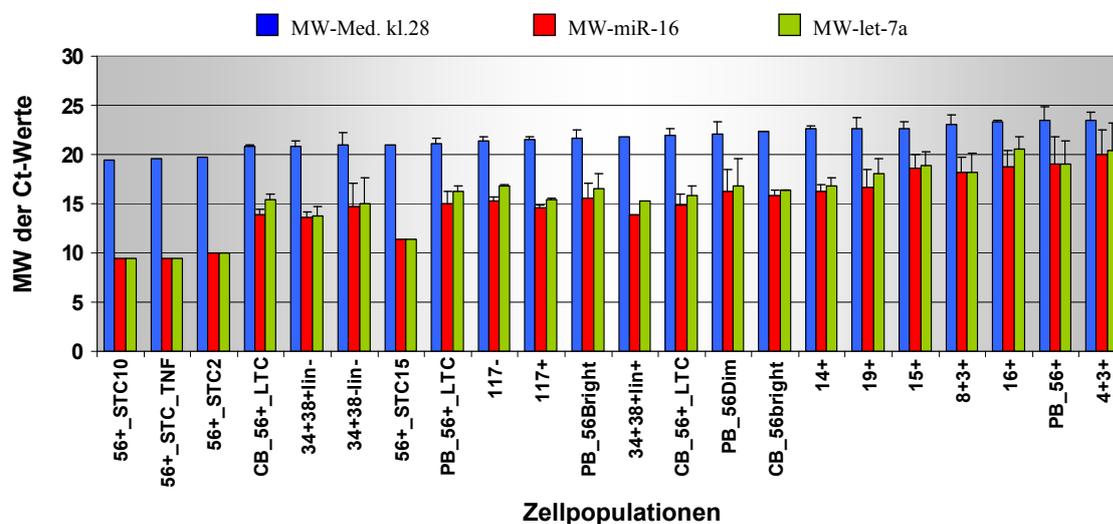
Zusammenfassend konnte unter Verwendung einer optimierten Zellzahl eine hohe Sensitivität gepaart mit einer sehr guten Reproduzierbarkeit für den 330-Multiplex PCR-Assay erlangt werden.

3.2.3 Etablierung einer geeigneten Normalisierungsmethode für den 330-Multiplex-Assay

Die Methode der Real-Time PCR erlaubt eine Quantifizierung der Expression untersuchter Gene im Vergleich verschiedener Proben zueinander. Für diesen Vergleich müssen die Daten allerdings normalisiert werden. Traditionell wird dafür ein Referenz-Gen gemessen, das in allen untersuchten Proben gleich stark exprimiert wird, so dass ein relativer Mengen-Vergleich durchgeführt werden kann. Bei den eingesetzten Referenz-Genen für die relative Quantifizierung von mRNA-Expressionsprofilen handelt es sich z.B. um die aufgrund ihrer ubiquitären Expression in allen Geweben auch als Housekeeping-Gene bezeichneten Gene *Tubulin*, *GAPDH*, *Aktin* oder 18S rRNA. Das jeweilige Referenz-Gen wird zur Normalisierung von den Fluoreszenzsignalen der gemessenen Gene abgezogen und so der delta-Ct-Wert ermittelt (wie unter Kap. 2.11.6 beschrieben). Somit können Schwankungen, welche aus variierenden Mengen an Ausgangsmaterial resultieren, ausgeglichen werden. Keines dieser Gene konnte als Normalisator für den 330-Multiplex Assay verwendet werden, da deren Expression sehr stark ist. Untersuchungen ergaben, dass die Supplementierung des Primer-Gemisch mit Primern für *GAPDH* oder 18S rRNA zu einer Verschiebung der PCR in Richtung dieser Gene führte. Somit war das Ergebnis für die miRNAs nicht mehr repräsentativ. Eine unabhängige Messung dieser Housekeeping-Gene in einem gesonderten Reaktionsansatz war jedoch auch nicht möglich, da keine Total-RNA isoliert wurde, sondern die Zellen lysiert und ohne weitere Aufreinigung der RNA direkt in die weiteren Reaktionsschritte eingesetzt wurden.

Für die miRNAs wurden bis vor kurzem die in allen Geweben exprimierten miRNA-Gene der *let-7*-Familie sowie *miR-16* als housekeeping-Gene favorisiert. Allerdings konnte kürzlich für beide miRNAs gezeigt werden, dass sie in die Regulation/Repression des Zellzyklus involviert sind, so dass eine differentielle Expression gemessen werden konnte (Johnson et al., 2007; Linsley et al., 2007). Um einen geeigneten Normalisierungsfaktor für die mittels des 330-Multiplex Assays ermittelten Expressionsdaten zu bestimmen, wurden drei verschiedene statistische Ansätze ausgesucht und getestet, die in Abb. 3.10 graphisch dargestellt sind. Um die publizierten Daten mit unseren Ergebnissen zu vergleichen, wurden die Ct-Werte von miR-16 in jeder Probe ermittelt und der Mittelwert von mindestens zwei unabhängigen Experimenten pro hämatopoietischer Zellpopulation inklusive Standardabweichung errechnet (Abb. 3.10, rote Balken.) Dieselbe Vorgehensweise wurde für *let-7a* angewandt (Abb. 3.10, grüne Balken).

In einem dritten Ansatz wurden der probenabhängige Median aller exprimierten miRNAs (Ct-Wert kleiner 28) als Normalisator benutzt. Die Mittelwerte der exprimierten miRNAs sind in der Grafik als blaue Balken dargestellt.



Normalisierung:

$$\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{Median\ expr.\ miRNAs}$$

Kalibrator : Median der Ct-Werte der exprimierten miRNAs

(exprimierte miRNAs = Ct < 29 für hES, Ct < 30 für HSC, Ct < 31 für hämatopoietische Zellpopulationen)

Abb. 3.10: Etablierung einer Normalisationsmethode für den 330-Multiplex PCR-Assay. Darstellt sind die Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten pro hämatopoietischer Zellpopulation für miR-16 (rot), let-7a (grün), sowie der Median für die exprimierten miRNAs (blau).

Wie der Vergleich verdeutlicht, sind die Unterschiede der gemittelten Ct-Werte im Falle von frisch isolierten Blutzellen gering und könnten vernachlässigt werden. Der Differenzwert zwischen hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen sowie ausdifferenzierten Blutzellen beträgt sowohl für miR-16 als auch für let-7a zwei PCR-Zyklen. Dies änderte sich, wenn primäre Zellen des peripheren Blutsystems kultiviert und dadurch stimuliert wurden (Abb. 3.10; *short time culture*, STC und *long time culture*, LTC). Die Differenz zwischen dem mittleren Ct-Wert kultivierter Zellen und nicht kultivierter Zellen beträgt zehn PCR-Zyklen für miR-16 und elf PCR-Zyklen für let-7a. Dies entsprach einem 500-fachen Expressionsunterschied. Somit schien diese Art der Normalisierung als nicht geeignet, die miRNA-Expression der unterschiedlichen Zellpopulationen unter den diversen Bedingungen zu quantifizieren. Deshalb wurde eine weitere Normalisierungsmethode getestet, bei der nicht ein einziges miRNA-Gen als Normalisator diente, sondern der Median aus allen exprimierten miRNAs bestimmt wurde (Abb. 3.10, blaue Balken). Wie anhand des Balkendiagramms deutlich wird, ist neben einer geringeren Standardabweichung bei der Errechnung der einzelnen Mittelwerte auch eine geringere Differenz über alle gemittelten Normalisatoren zu erkennen (Differenzunterschied von maximal vier PCR-Zyklen). Somit erschien eine Normalisierung nach der unten angeführten delta-Ct-Methode für diesen Versuchsaufbau als am geeignetsten und wurden im folgenden auf alle untersuchten Proben angewandt:

$$\Delta Ct = Ct\text{-Wert}_{miRNA} - Ct\text{-Wert}_{\text{Median der exprimierten miRNAs}}$$

3.3 MiRNA-Expressionsprofile in diversen Zellpopulationen im Verlauf der Hämatopoese

Die Analyse der microRNAs in diversen Spezies und Zelltypen ist ein rasch expandierendes Forschungsgebiet. Bis dato wurden miRNA-Expressionsprofile u.a. in *C. elegans* (Lee and Ambros, 2001), Zebrafisch (Chen et al., 2005) und der murinen Hämatopoese (Monticelli et al., 2005) bzw. hämatopoietischer Zellpopulationen untersucht (Landgraf et al., 2007; Ramkissoon et al., 2006). Eine globale Analyse der diversen Populationen der humanen Hämatopoese im Vergleich zueinander stand bis zur Veröffentlichung der Klondaten aus dem Labor von Prof. Tuschl (Landgraf et al., 2007) aus. Neben hämatopoietischen Zelltypen wurden in dieser Arbeit die Daten diverser anderer Zell- und Gewebetypen dargestellt. Allerdings erlaubt diese Methode keine wirkliche Quantifizierung der Expression. Zusätzlich können Subpopulationen mit geringer Frequenz im Blutssystem aufgrund des hohen benötigten Materialaufwandes zur Erstellung einer Klonbank nicht untersucht werden.

3.3.1 Isolation der verschiedenen hämatopoietischen Zellpopulationen

Die humane Hämatopoese gliedert sich in unterschiedliche Entwicklungs- und Differenzierungsstadien. Aus der sogenannten hämatopoietischen Stammzelle (HSC) erfolgt über das Stadium der hämatopoietischen Vorläuferzelle (HPC) die Reifung der myeloiden sowie lymphoiden Zelltypen (siehe Abb. 3.11). Je nach Art der ausdifferenzierten Zellen unterscheidet man zwischen der Leukopoese (Bildung weisser Blutkörperchen), der Thrombopoese (Bildung von Plättchen) und der Erythropoese (Reifung der roten Blutkörperchen). Bis auf die Erythrozyten wurden alle verschiedenen reifen Zelltypen der Hämatopoese gesondert isoliert (Isolation aufgrund der in Abb. 3.11 dargestellten Oberflächenmarker) und unter Verwendung des 330-Multiplex PCR Assays untersucht.

Um die miRNA-Expression des hämatopoetischen Systems zu untersuchen, wurden aus gesunden Spendern (Durschnittalter 32,2 Jahre) periphere ausdifferenzierte Zellen der folgenden Populationen isoliert: Monozyten (CD14⁺-Zellen), Granulozyten (CD15⁺-Zellen), Thrombozyten (CD61⁺-Zellen), zytotoxische T-Zellen (CD8⁺CD3⁺), T-Helferzellen (CD4⁺CD3⁺), B-Zellen (CD19⁺CD3⁻), sowie NK-Zellen (CD56⁺3⁻).

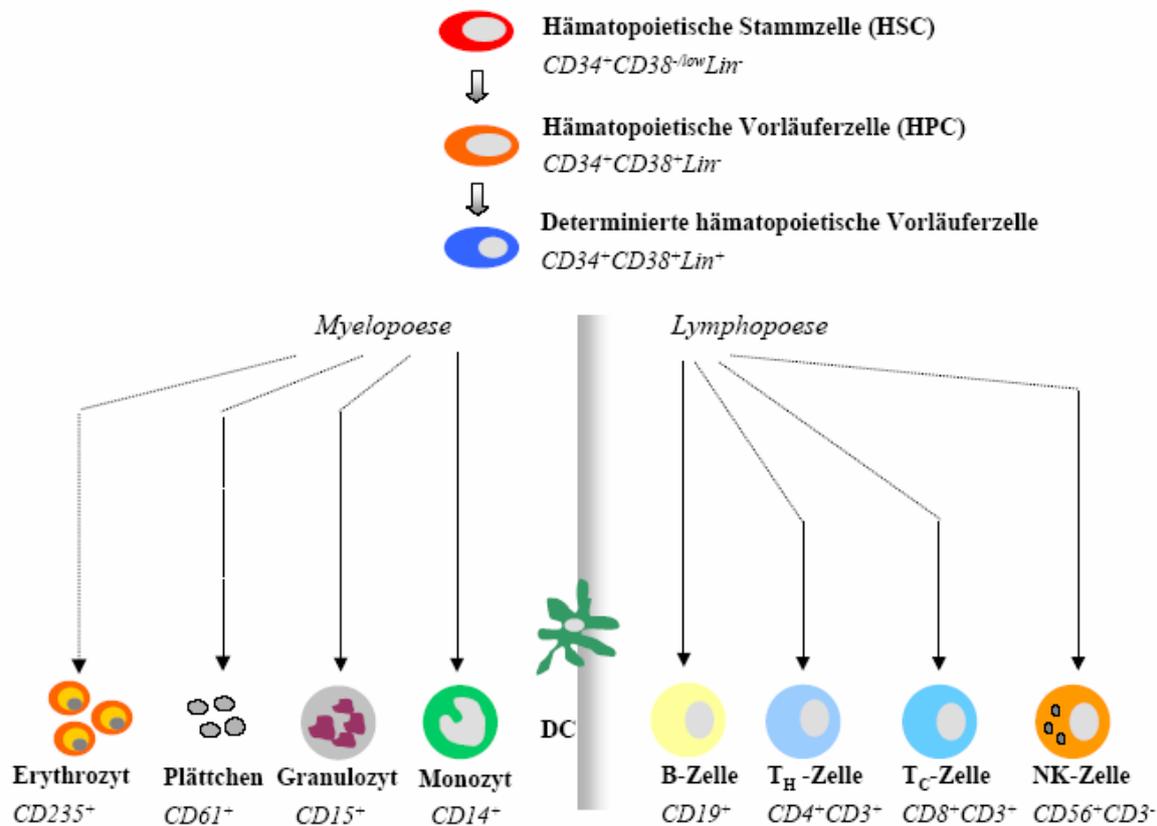


Abb. 3.11 Schema der Hämatopoese. Verlauf der Reifung ausdifferenzierter hämatopoietischer Zellen aus hämatopoietischen Stamm- (HSC) und Vorläuferzellen (HPC). Die Zellpopulationen sind mit ihren charakteristischen Oberflächenmarkern, welche für die Zellseparation benutzt wurden, versehen.

Die hämatopoietischen Stammzellen (HSC, $CD34^+CD38^+lin^-$), Hämatopoese-Progenitor-Zellen (HPC, $CD34^+38^+lin^-$), sowie Vorläuferzellen mit Oberflächenmarkern für hämatopoietische Zelllinien ($CD34^+38^+lin^+$) konnten aufgrund ihrer geringen Frequenz nicht aus dem peripheren Blutsystem Erwachsener gewonnen werden. Dafür wurde das Nabelschnurblut Neugeborener (*cord blood*, CB) genutzt, welches freundlicherweise von Frau Prof. Kögler von der Nabelschnurblutbank Düsseldorf zur Verfügung gestellt wurde. Auch die dendritischen Zellen sind mit 0.1 % der Leukozyten sehr gering im Blutsystem vorhanden. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten dendritischen Zellen (DCs) wurden unter Verwendung eines *in vitro* Kultivierungssystems aus Monozyten differenziert und freundlicherweise von PD Dr. Sorg (ITZ, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Die pluripotenten humanen embryonalen Stammzellen (hESC) wurden freundlicherweise von Prof. Brüstle (Life and Brain, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

Die Isolation der Zellen erfolgte nach dem in Abb. 3.12 dargestellten Schema.

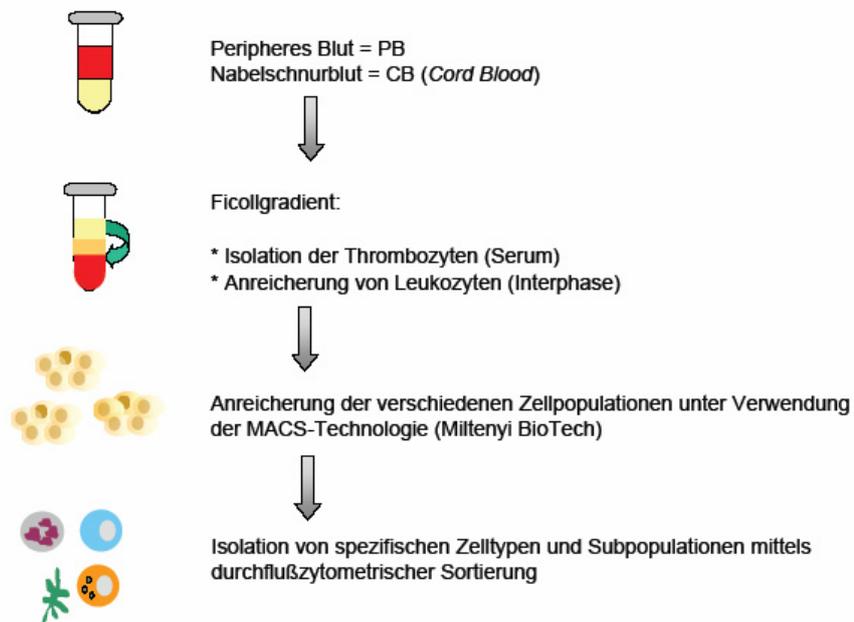


Abb. 3.12: Schema zur Anreicherung hämatopoietischer Zellpopulationen.

Nach der Anreicherung der Leukozyten in der Interphase des Ficoll-Gradienten, konnten die obere, serumhaltige Phase inklusiver der darin lokalisierten Thrombozyten abgenommen werden. Im Anschluss daran wurden die Thrombozyten pelletiert und gewaschen (nach Rox et al., 2004). Die Reinheit der so gewonnenen Plättchen wurde mittels May-Grünwald-Färbung kontrolliert

Bei den Thrombozyten handelt es sich um kleine, kernlose Zellen, die sich nach dem Vorläuferstadium als unreife Megakaryozyten abschnüren und dadurch den Zellkern verlieren. Jedoch besitzen die kernlosen Plättchen noch Nukleinsäuren, wenn auch im Vergleich zu anderen Zelltypen der Hämatopoiese in geringeren Mengen, was Microarray-Analysen der mRNA-Expression erlaubte (Healy et al., 2006; Rox et al., 2004). Diese Beobachtungen legten die Untersuchung der Thrombozyten auf miRNA-Expression nahe. Aus dem bereits erwähnten Grund der geringeren Größe und verminderten RNA-Menge wurde für diese Zellpopulation eine zehnfach höhere Zellmenge angewandt (50000 statt der sonst verwendeten 5000 Zellen).

Die in der Interphase des Ficoll-Gradienten lokalisierten leukozytären Zellpopulationen wurden in Abhängigkeit von ihrer Frequenz entweder direkt der Zelltyp-spezifischen Gewinnung mittels durchflusszytometrischer Zellseparation mittels fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern unterzogen ($CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowie $CD19^+$ B-Zellen,

Kap. 2.10.3.11) oder aber in einem vorgeschaltetem Schritt zunächst mit der MACS-Technologie (siehe Kap. 2.10.3.7) angereichert und anschliessend mittels Zellsortierung gewonnen (CD56⁺ NK-Zellen, HSC und HPC).

Die durchflusszytometrische Zellsortierung wurde jeweils auf das Lymphozytenfenster bezogen, in dem sich der Hauptanteil an lebenden Zellen befindet. Dadurch wurde eine Anreicherung toter Zellen im Verlauf des Sortiervorgangs verhindert. Das Sortieren unspezifisch gefärbter Zellen wurde mit Hilfe von Kontrollen vermieden.

Die ebenfalls in der Interphase des Ficoll-Gradienten lokalisierten Granulozyten konnten nicht unter Verwendung des Durchflusszytometers angereichert werden, da sie oftmals im Verlauf der Sortierung platzen und aufgrund der frei werdenden DNA verklumpen.

Um diese Zellpopulation aus dem Leukozytengemisch zu isolieren, wurden die Zellen mit einem ferromagnetisch-konjugierten, anti-CD15-Antikörper gefärbt und mittels MACS separiert. Die Granulozyten lassen sich in die basophilen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten unterteilen, wobei die Neutrophilen über 90% der Granulozytenpopulation ausmacht. Anhand dieses Verhältnisses im peripheren Blut und einer verstärkten CD15-Oberflächenexpression wurden die Neutrophilen im MACS angereichert und es handelt sich bei den analysierten Granulozyten nicht um eine Mischpopulation aus den granulozytären Subpopulationen. Die Reinheit der angereicherten Granulozyten wurde entweder mittels May-Grünwald-Färbung mikroskopisch oder anhand der Oberflächenmarker im FACS (Abb. 3.13) kontrolliert.

Alle gesorteten Zellpopulationen wurden im Anschluss an die durchflusszytometrische Zellsortierung auf ihre Reinheit kontrolliert. Abb. 3.13 zeigt jeweils ein repräsentatives Sortierergebnis für die jeweiligen Zellpopulationen.

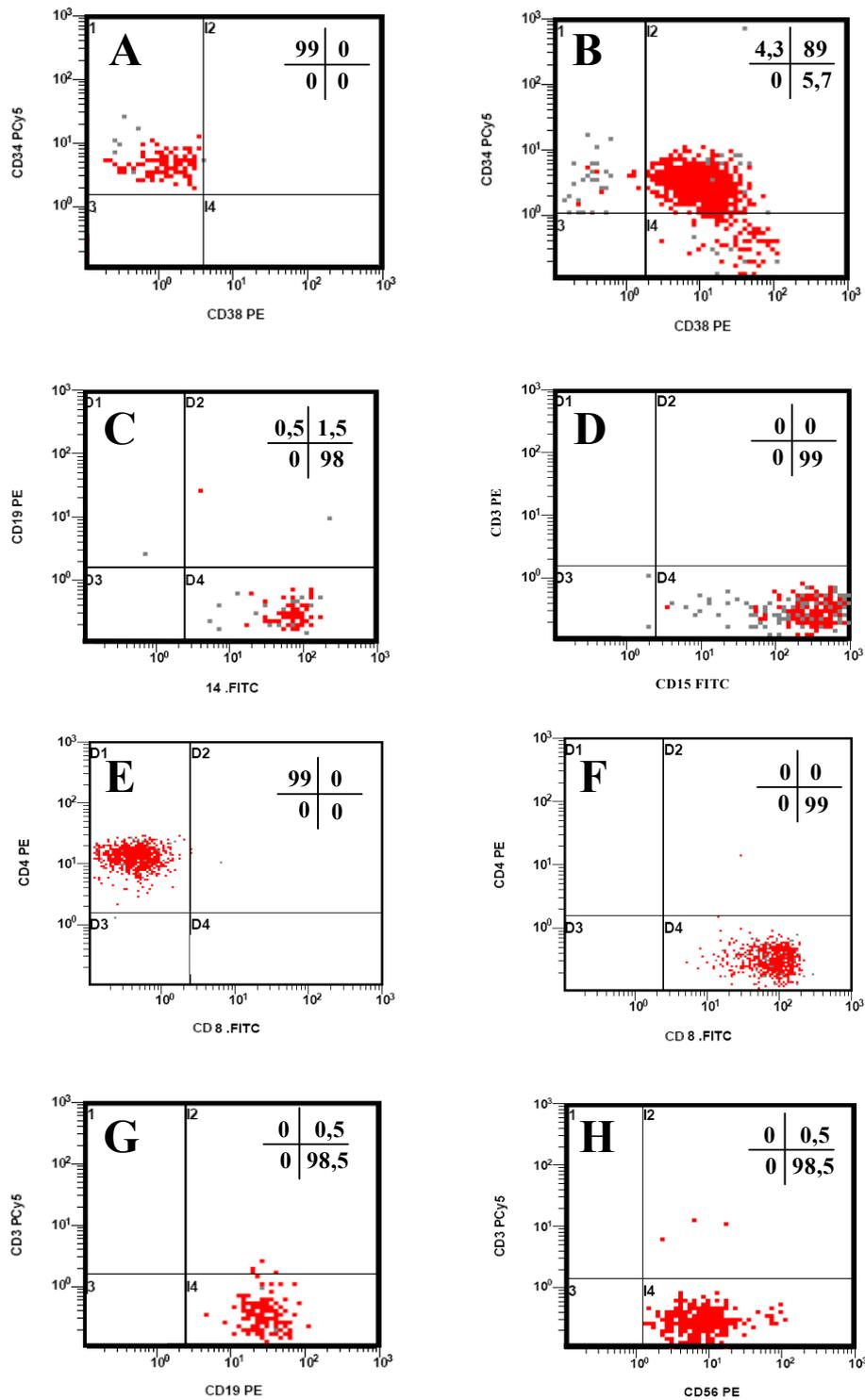
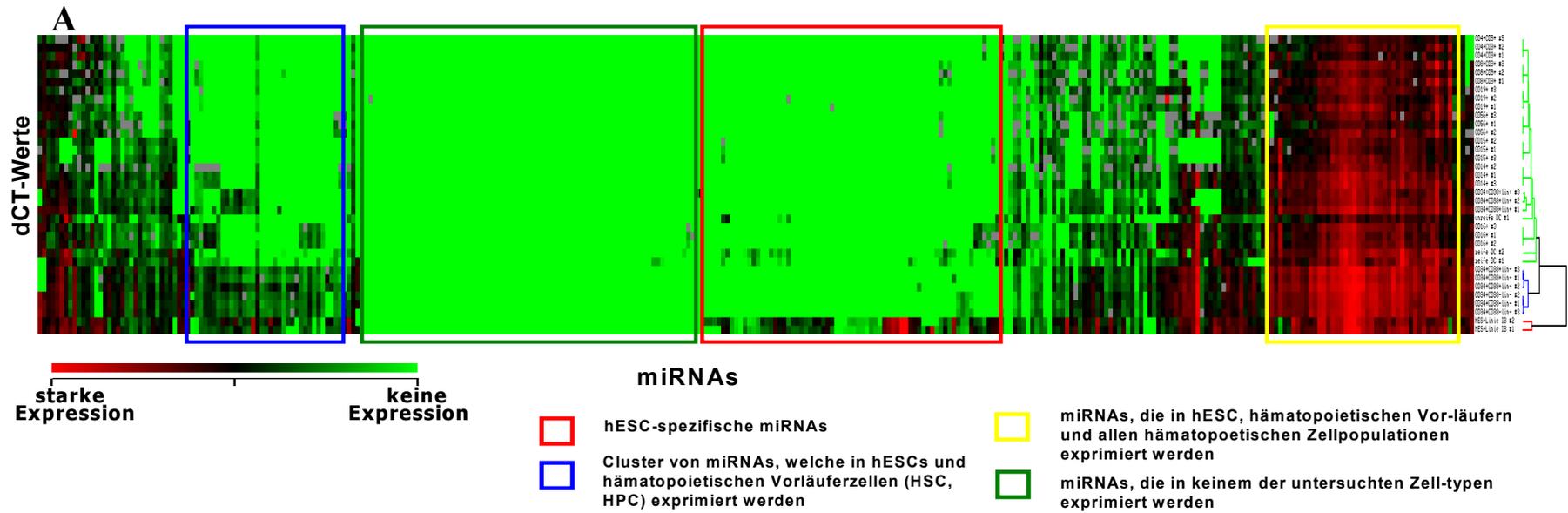


Abb. 3.13: FACS-Analyse der durchflusszytometrisch isolierten Zellpopulationen. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis für die jeweilige hämatopoietische Zellpopulation (A=HSC; B=HPC; C=Monozyten; D=Granulozyten; E=CD4-positive T-Zellen; F=CD8-positive T-Zellen, G=B-Zellen; H=NK-Zellen). Die Analyse wurde mit Ausnahme der Monozyten sowie Granulozyten auf das Lymphozytenfenster bezogen. Im Gitter ist die Reinheit der Zellen in Prozent angegeben.

3.3.2 miRNA-Profile im Verlauf der Hämatopoese

Mit Ausnahme der DC's (2 unabhängige Spender und *in-vitro*-Differenzierungsansätze) und den humanen embryonalen Stammzellen (2 unabhängige Experimente mit der hES-Zelllinie I3) wurden von jeder Zellpopulation mindestens drei verschiedene Spender in unabhängigen Untersuchungen eingesetzt und die Expressionsstärke von 330 verschiedenen miRNAs gemessen und normalisiert (Kap. 2.11.7.1). Um die Ähnlichkeit der einzelnen Zellpopulationen zueinander zu verdeutlichen, wurde eine nicht unterstützte hierarchische Clusteranalyse nach Eisen (Eisen et al., 1998) mit unnormalisierten sowie normalisierten Ct-Werten durchgeführt. Die Clusteranalyse für die einzelnen Spenderpopulationen ist in Abb. 3.14A graphisch dargestellt. Es wurden normalisierten Ct-Werte (dCT) von drei unabhängigen Spenderprofilen in die Ähnlichkeitsabfrage eingebracht. Die rote Farbkodierung gibt dabei eine starke miRNA-Expression wieder, während die grünen Farbbalken für eine schwache bzw. keine Expression der jeweiligen miRNA stehen. Schwarze Farbbalken repräsentieren die gleiche Expressionsstärke zwischen verschiedenen Spendern und/oder Zellpopulationen. Eine graue Farbkodierung steht für nicht auswertbare Datenpunkte.

In der Analyse ist deutlich zu erkennen, dass die humanen embryonalen Stammzellen (hESC) getrennt von allen anderen Zellpopulationen angeordnet sind (=clustern) und einen eigenen Ast in diesem Stammbaum besitzen. Die Ähnlichkeit zwischen den hESC und allen anderen Zelltypen betrug 76% (Abb. 3.14B). Bei den Zelltypen des hämatopoietischen Systems ordneten sich die CD34-positiven hämatopoietischen Stamm-/Vorläuferzellen (die CD34⁺CD38⁻lin⁻-Zellfraktion, in der die hämatopoietischen Stammzellen angereichert wurden, werden im folgenden als HSC bezeichnet, während die CD34⁺CD38⁺lin⁻-Zellfraktion als HPC bezeichnet werden) getrennt von allen ausdifferenzierten somatischen Zellen an und weisen einen Verwandtschaftsgrad von 90,5% auf. Der Ast der hämatopoietischen Stammzellen gliedert sich - trotz der hohen Übereinstimmung der beiden Profile von 96,9% - zusätzlich aufgrund von Unterschieden im Expressionsprofil noch in zwei Unterfamilien auf; in die Familie der Zellen der Stammzell-angereicherten Population (CD34⁺CD38⁻Lin⁻) und die CD34⁺CD38⁺Lin⁻ exprimierenden hämatopoietischen Vorläuferzellen (HPC). Bei der Betrachtung des Dendrogramms wird weiterhin deutlich, dass alle ausdifferenzierten hämatopoietischen Zelltypen einen gemeinsamen dritten Ast bilden (Abb. 3.14).



B

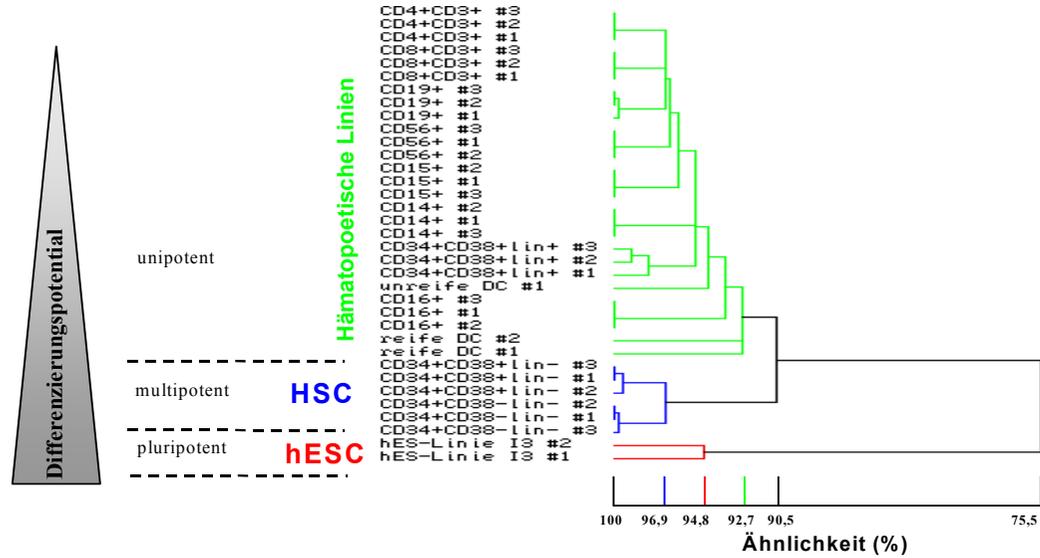


Abb. 3.14 miRNA-Expressionsprofil im Verlauf der Hämatopoese. (Seite 84)

A) Clusteranalyse hämatopoietischer Zellpopulationen sowie humaner embryonaler Zellen (hESC) der Linie I3 unter Verwendung von normalisierten Ct-Werten (dCT). Es wurden für jeden Zelltyp mit Ausnahme der hESC drei unabhängige, gesunde Spender analysiert. Die rote Farbkodierung repräsentiert eine starke miRNA-Expression wieder, während die grünen Farbbalken für eine schwache bzw. keine Expression der jeweiligen miRNA stehen. Schwarze Farbbalken repräsentieren die gleiche Expressionstärke zwischen verschiedenen Spendern und/oder Zellpopulationen. Eine graue Farbkodierung steht für nicht auswertbare Datenpunkte. B) Vergrössertes Dendrogramm der Clusteranalyse in A.

Dieser Ast unterteilt sich jedoch zusätzlich in zwei kleinere Äste, in die sich die Zellen in Abhängigkeit von ihrer Zugehörigkeit zum lymphoiden bzw. myeloiden Zweig der Hämatopoese einordnen.

Aus der dargestellten Clusteranalyse gehen somit drei, durch ihre miRNA-Expressionsprofile unterscheidbare Familien hervor; die hESC, die HSC/HPC sowie die Zellen der hämatopoetischen Linien, wobei sich letztere in einen myeloiden und einen lymphoiden Zellen aufteilen. Der Aufgliederung in drei verschiedene Familie liegen entsprechende miRNA-Expressionssignaturen zugrunde, die in Abb. 3.14 durch farbige Fenster hervorgehoben wurden.

Neben einer größeren Anzahl von hESC-spezifischen miRNAs findet sich in der Clusteranalyse eine kleinere Gruppe von miRNAs, die sowohl in hESC als auch in HSC exprimiert werden (Abb. 3.14A). Weiterhin existiert eine Gruppe von miRNAs, die in allen drei Familien gemeinsam exprimiert werden. Die Anzahl an nicht-detektierten miRNAs macht ein Drittel der 330 untersuchten Gene aus. Korrelierend zu unseren Daten konnten diese miRNAs auch in den Untersuchungen der Hämatopoese durch die Gruppe von Tuschl nicht detektiert werden.

Die Ähnlichkeit der einzelnen Zellpopulationen des Blutsystems sowie bei den multipotenten hämatopoietischen Zelltypen wird verdeutlicht, wenn man die folgende Abbildung betrachtet (Abb. 3.15). In dieser graphischen Darstellung wurden die Expressionsprofile einzelner Zellpopulationen von zwei verschiedenen unabhängigen Spender in einem Streudiagramm aufgetragen. Der dargestellte Korrelationskoeffizient R^2 ist der Mittelwert aller durchgeführten Experimente für den jeweiligen Zelltyp. Anhand dieser Darstellung wird klar, dass die Varianz in der miRNA-Expression bei ausdifferenzierten Zelltypen deutlich höher ist als bei den Stammzell-artigen Zellen des hämatopoietischen Systems.

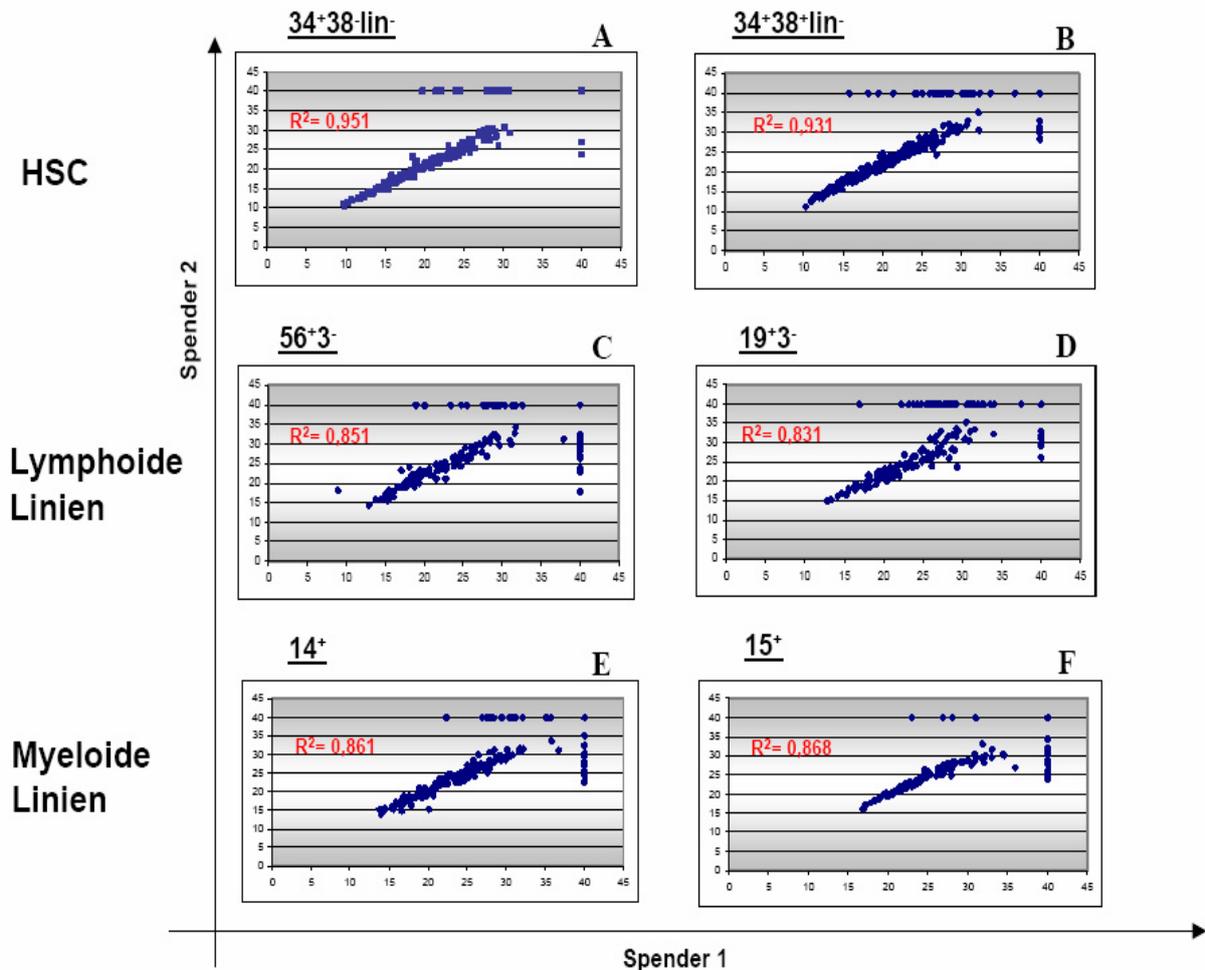


Abb. 3.15 Diversität der Spender. In den Scatterplots sind die miRNA-Expressionsprofile für unterschiedliche Zellpopulationen von jeweils zwei unabhängige Experimente unter Verwendung verschiedener Spender dargestellt. Der Korrelationskoeffizient R^2 repräsentiert den Mittelwert aller Spender des jeweiligen Zelltyps. Bei den Datenpunkten handelt es sich um unnormalisierte Werte (Ct-Werte).

Bei der Untersuchung der ausdifferenzierten Zelltypen hatte die Spender-spezifische miRNA-Expression einen wesentlich höheren Einfluss auf das Endergebnis als dies bei den Vorläuferzellen der Fall war, was sich auch in einem geringeren Prozentsatz an Übereinstimmung widerspiegelte. Die Homogenität der miRNA-Expressionsmuster war in der Population mit dem höchsten Stammzellpotential ($CD34^+CD38^-lin^-$) am höchsten. Mit einem Korrelationskoeffizienten von über 95% weist diese Population eine hochspezifische miRNA-Signatur auf. Die weniger primitive HPC-Population besitzt eine etwas geringere Homogenität, während ausdifferenzierte hämatopoietische Zellarten wie NK-Zellen, B-Zellen, Monozyten und Granulozyten wesentlich stärkere individuelle Schwankungen der miRNA-Signatur aufweisen.

3.3.2.1 MiRNA-Expressionsunterschiede zwischen humanen ES-Zellen, HSC und HPC

In der globalen miRNA-Genexpressionsanalyse konnte ein Cluster von miRNAs identifiziert werden, welcher in den drei stammzellartigen Zelltypen hESC, HSC und HPC, nicht aber in den differenzierten Zellpopulationen exprimiert wird. Um nun auch die Expressionsunterschiede zwischen diesen drei Stammzelltypen tiefergehend zu untersuchen, wurden die exprimierten miRNAs in eine statistische Analyse nach Venn eingebracht (siehe Kap. 2.12.6.2). Der oben angesprochene Cluster der gemeinschaftlichen Expression beinhaltet zunächst 165 miRNAs, die in der Schnittmenge aller drei Populationskreise zu finden sind und 72,7% aller miRNAs entspricht (Abb. 3.16). Zusätzlich konnten verschiedene Schnittmengen zwischen den unterschiedlichen Stammzelltypen ermittelt werden, die sich aus den möglichen Zweierkombinationen ergaben.

Um die genauen Verhältnisse zwischen den einzelnen Stammzelltypen zu analysieren, wurden Clusteranalysen der miRNAs für die einzelnen Schnittmengen erstellt.

Die Schnittmenge zwischen den pluripotenten hESC und den multipotenten HSC beinhaltet 10 miRNAs, die sowohl in hES-Zellen als auch in HSCs, allerdings nicht in HPC exprimiert werden (miR-379, miR-410, miR-519c, miR-18b, miR-106a, miR30a-3p, miR-34b, miR-203, miR-489, let-7a).

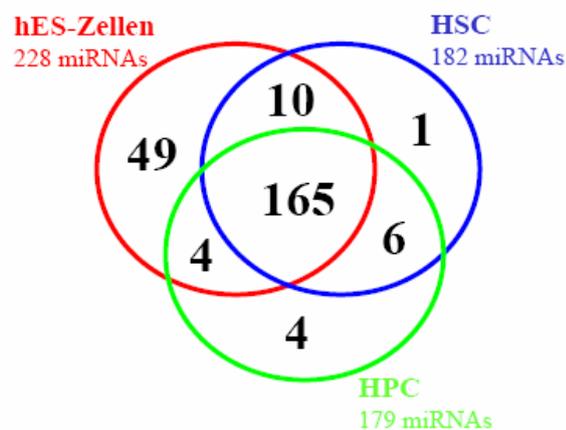


Abb. 3.16: miRNA-Expressionmuster in Stammzellen.

Venn-Diagramm mit Expressionsdaten in humanen embryonalen Stammzellen (hESC, rot), hämatopoietischen Stammzellen (HSC, blau) und hämatopoietischen Vorläuferzellen (HPC, grün).

Eine weiterführende Clusteranalyse zeigt, dass diese Schnittmenge an miRNAs wiederum in drei weitere Untergruppen unterteilt werden kann (Abb. 3.17A, *hESC & HSC*). Wie Abbildung 3.17A zeigt, lassen sich innerhalb dieser Schnittmenge drei Untergruppen unterscheiden, deren miRNAs in differenzierten hämatopoietischen Zellen entweder gar nicht (I), schwach (II) oder stark exprimiert (III) sind.

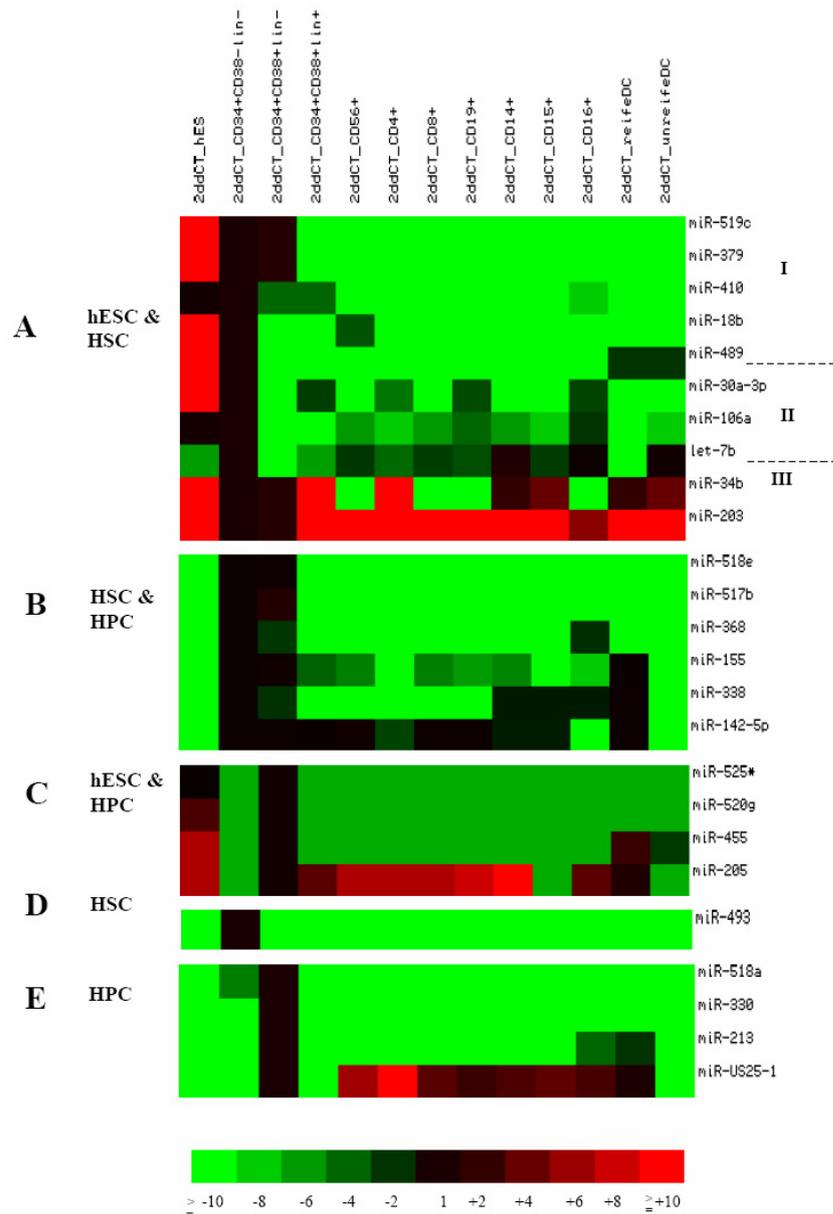


Abb. 3.17: Vergleich der Expressionsänderungen von miRNAs zwischen Stammzellen und differenzierten hämatopoietischen Zellen. Die Schnittmenge aus dem Venndiagramm von Abb. 3.16 ist jeweils links vom Cluster angeführt. Expressionsänderung normalisiert auf HSC (Werte =1, A, B, D). Expressionsänderung normalisiert auf HPC (Werte =1, C und E). Die der x-fachen Expressionsänderung entsprechende Farbkodierung ist anhand des Farbbalkens dargestellt. Die Untergruppen I bis III sind im Text erklärt.

Auffällig ist hierbar miR-203 (Untergruppe III), die im Vergleich zu den HSC/HPC eine starke Expression in allen primären Leukozyten und hES-Zellen (mehr als 10-fach) zeigt, was darauf schliessen lässt, dass miR-203 in HSC/HPC runterreguliert wird.

Die Schnittmenge zwischen den hämatopoietischen Stammzellen (HSC) und den reiferen hämatopoietischen Vorläuferzellen (HPC) wird durch sechs miRNAs repräsentiert (Abb. 3.17B, *HSC & HPC*). Das hervorstechenste Merkmal dieser Gruppe, die sich aus den miRNAs miR-142-5p, miR-155, miR-338, miR-368, miR-517b und miR-518e zusammensetzt, ist die Tatsache, dass keine Expression in den pluripotenten hES-Zellen detektiert werden konnten. Von diesen werden die miRNAs miR-368, miR-517b und miR-518e exklusiv in den Stammzellstadien der Hämatopoese exprimiert und können demzufolge als spezifisch für hämatopoietische Stammzellen angesehen werden.

Die Schnittmenge aus hES-Zellen und HPCs bilden die folgenden vier miRNAs miR-525*, miR-520g miR-455 und miR-205 (Abb. 3.17C). Die ersten drei konnten im Vergleich zu allen untersuchten Proben ausschliesslich in hES-Zellen und HPCs detektiert werden. Die ebenfalls in der Schnittmenge hESC/HPC lokalisierte miRNA miR-205 kommt zwar nicht in HSCs vor, wird aber in fast allen hämatopoietischen Zellen stark exprimiert, was auf eine Funktion im Verlauf der Differenzierung unreifer Stammzellen zu reifen Zellen des Blutsystems hindeutet.

Für die primitiveren HSC war nur eine einzige miRNA als spezifisch nachweisbar, die allerdings auch in HPC schwach (Ct-Wert = 30) exprimiert war (Abb. 3.17D). Nichtsdestotrotz kann die Expression ein Hinweis darauf sein, dass miR-493 eine Rolle in der Aufrechterhaltung des multipotenten Zustandes der HSC spielt.

Schliesslich konnten vier miRNAs ermittelt werden (miR-213, miR-US-25-1, miR-330 und miR-518a), die nur in HPC vorkamen. Von diesen wird nur miR-US25-1 auch in differenzierten hämatopoietischen Zellen exprimiert (Abb. 3.17E).

Interessanterweise ergab der Vergleich von HSC, HPC und hESC (Abb. 3.16), dass eine grosse Anzahl an miRNAs nur in hESCs aber nicht in hämatopoieschen Stammzellen exprimiert wird. Eine globale Analyse dieser 49 hESC-spezifischen miRNAs für alle gemessenen Zellpopulationen ergab die Gliederung in zwei Untergruppen (Abb. 3.18, Gruppe I und Gruppe II).

hESC+		
	I	II
<i>miR-96</i>	miR-369-5p	<i>miR-139</i>
miR-122a	miR-371	miR-206
<i>miR-124a</i>	miR-373*	miR-218
<i>miR-149</i>	miR-383	miR-1
miR-149	miR-449	miR-182
<i>miR-182*</i>	<i>miR-452*</i>	<i>miR-188</i>
<i>miR-183</i>	miR-488	<i>miR-9*</i>
<i>miR-184</i>	<i>miR-490</i>	<i>miR-204</i>
<i>miR-187</i>	<i>miR-508</i>	<i>miR-129</i>
miR-302a*	<i>miR-509</i>	<i>miR-95</i>
miR-302b	miR-515-5p	<i>miR-224</i>
miR-302b*	miR-516-3p	miR-211
miR-302c	miR-519e*	miR-31
miR-302c*	miR-520a*	
miR-302d	miR-520b	
<i>miR-326</i>	miR-520c	
miR-337	miR-520e	
miR-367	miR-525	

Abb. 3.18: hESC-spezifische miRNA im Vergleich zu hämatopoietischen Stammzelltypen.

Exklusiv in hES-Zellen exprimierte miRNAs: Gruppe I beinhaltet miRNAs, welche nur in hESC's detektiert werden konnten (schwarze Daten), während rote Namen miRNAs hervorheben, die auch in bei kultivierten Zellen gemessen werden konnten. Gruppe II zeigt miRNAs, die auch in ausdifferenzierten hämatopoietischen Zellpopulationen detektiert wurden. Die blauen miRNAs heben die miRNAs hervor, welche zusätzlich unter *in-vitro* Bedingungen gemessen wurden.

Gruppe I repräsentiert 36 der 49 miRNAs, welche im Vergleich zu allen frisch isolierten Zellpopulationen exklusiv in den hESCs detektiert werden konnten. Eine umfassendere Analyse unter Einbeziehung von kultivierten Zellen zeigte, dass einige miRNAs aus Gruppe I auch in *in vitro* kultivierten Zellen (stimulierte NK-Zellen, Jurkat-Zellen, HeLa-Zellen) exprimiert wurden. Diese zwölf miRNAs sind in der Tabelle in rot hervorgehoben (Abb. 3.18). Demgegenüber beinhaltet Gruppe II 13 miRNAs, die zunächst als hESC-spezifisch detektiert wurden waren, jedoch in einer globalen Genexpressionsanalyse auch in ausdifferenzierten hämatopoietischen Zellpopulationen gemessen werden konnten. Diese miRNAs waren nicht in den hämatopoietischen Stammzellen exprimiert und somit nicht im Venn-Diagramm repräsentiert. Auch bei den miRNAs der Gruppe II zeigte die Analyse welche auf, die unter Kulturbedingungen eine Expression zeigten. Diese miRNAs sind in der Tabelle in blau markiert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass 24 hESC-spezifische miRNAs gemessen werden konnte. Es kann vermutet werden, dass es sich bei diesen miRNAs um regulatorische Faktoren in hESCs handelt, die die Aufrechterhaltung des pluripotenten Stadiums unterstützen und eine Differenzierung in unterschiedliche Zell- und/oder Gewebetypen unterbinden.

Bei den 12 rot markierten miRNAs aus Gruppe I scheint es sich um solche miRNA-Gene zu handeln, die durch die Kultivierungsbedingungen aktiviert werden. Da es sich bei den hESC-Zellen ebenfalls um kultivierte Zellen handelt, kann die gemessene miRNA-Expression eher als Kultivierungsartefakt angesehen werden denn als spezifisch für hESCs. Bei den in Gruppe II lokalisierten miRNAs kann gemutmasst werden, dass es sich um solche handelt, die in den hESCs die Differenzierung in hämatopoietische Zelltypen ermöglichen können und in ausdifferenzierten hämatopoietischen Linien der Aufrechterhaltung des Zelltypes dienen.

3.3.2.2 Reduktion des miRNA-Repertoires in determinierten HPCs ($CD34^+CD38^+lin^+$)

Zusätzlich zu den primitiveren, $CD34^+CD38^-lin^-$ hämatopoietischen Stammzellen (HSC) und den reiferen $CD34^+CD38^+lin^-$ hämatopoietischen Vorläuferzellen (HPC) wurden auch Zellen untersucht, die neben CD34 und CD38 auch die Lineage-Marker (CD3, CD4, CD8, CD56, CD14, CD19) auf ihrer Oberfläche exprimieren ($CD34^+CD38^+lin^+$ -Zellen). Diese Zellen sind bereits auf eine Differenzierung in Richtung lymphoider oder myeloider Zelltyp festgelegt und werden nachfolgend als determinierte HPC (dHPC) bezeichnet.

Um die Frage zu beantworten, wie die miRNA-Expression in determinierten hämatopoietischen Stammzellen im Vergleich zu multipotenten Stammzellen der Hämatopoese aussieht, wurden die miRNA-Profile der drei Zellpopulationen verglichen. Auffällig ist eine Abnahme an detektierbaren miRNAs im Falle der determinierten HPCs (dHPC, Abb. 3.19). Während für die HSC und HPC eine nahezu vergleichbare Menge an miRNAs gemessen wurde (182 versus 179 miRNAs), sinkt die Anzahl bei den dHPCs auf 124 miRNAs. Demzufolge reduzierte sich die Menge an miRNAs in der Schnittmenge zwischen allen drei Proben auf 118 miRNAs verglichen mit gemeinsamen 171 miRNAs zwischen HSC und HPC. Fast alle der miRNAs in dHPCs finden sich in den differenzierten hämatopoietischen Linien wieder, d.h. dieser Progenitorzelltyp besitzt bereits eine miRNA-Signatur reifer Blutzellen.

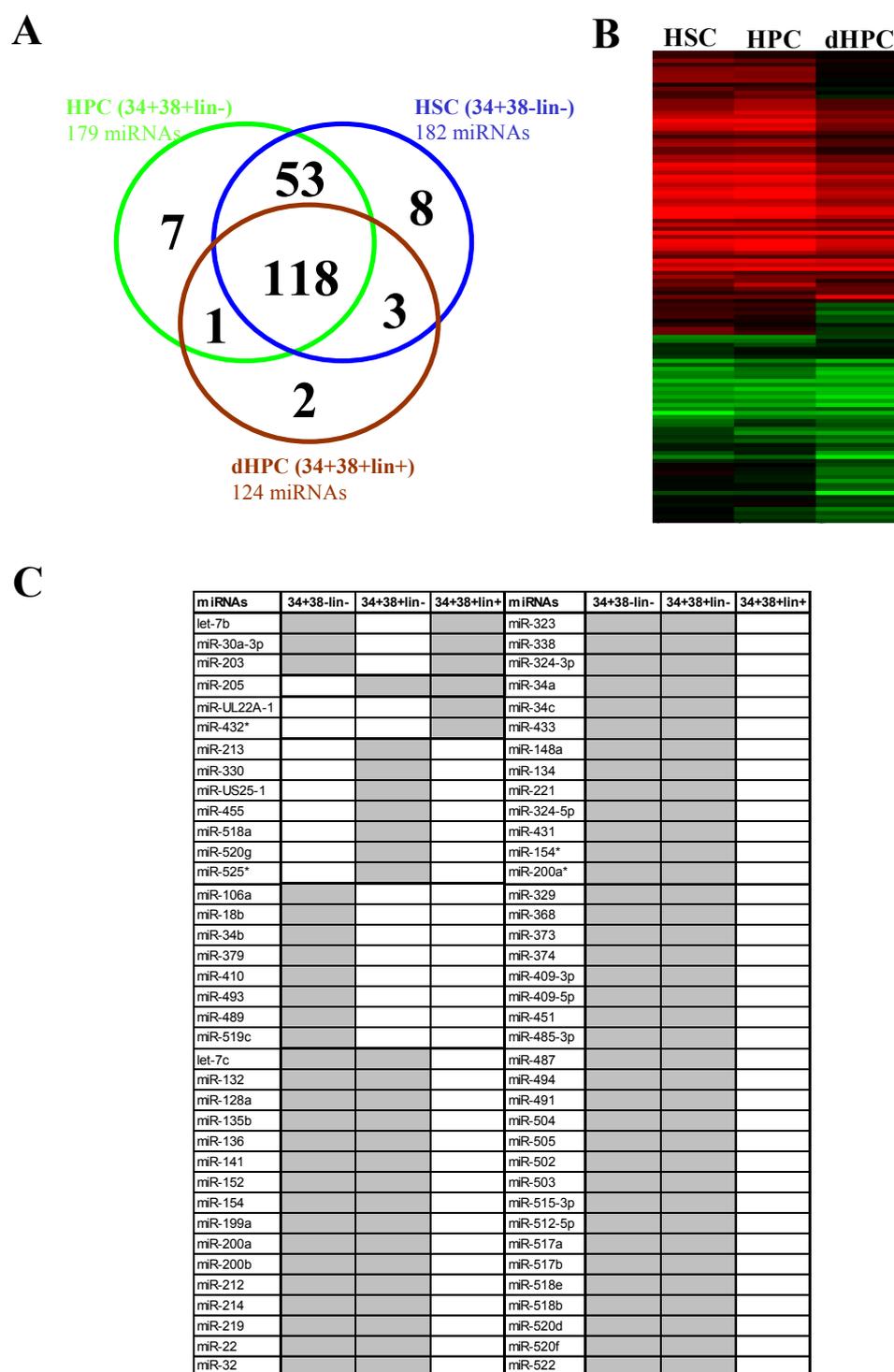


Abb. 3.19: miRNA-Expressionsmuster in den hämatopoietischen Stammzellentypen.

A) Korrelation der miRNA-Expression in hämatopoietischen Stammzelltypen anhand eines Venn-Diagramms. B) Clusteranalyse der 118 gemeinsam in allen drei Stammzelltypen exprimierten miRNAs. (Mittelwerte der dCT-Werte aus drei unabhängigen Experimenten). Rote Datenpunkte entsprechen einer starken Expression, während grüne eine schwache bzw. keine Expression der jeweiligen miRNA anzeigt. C) Liste der in der jeweiligen Schnittmenge und/oder Zellpopulation exprimierten miRNAs. Graue Felder geben exprimierte miRNAs an, während weiße Felder nicht nachweisbare miRNAs repräsentieren.

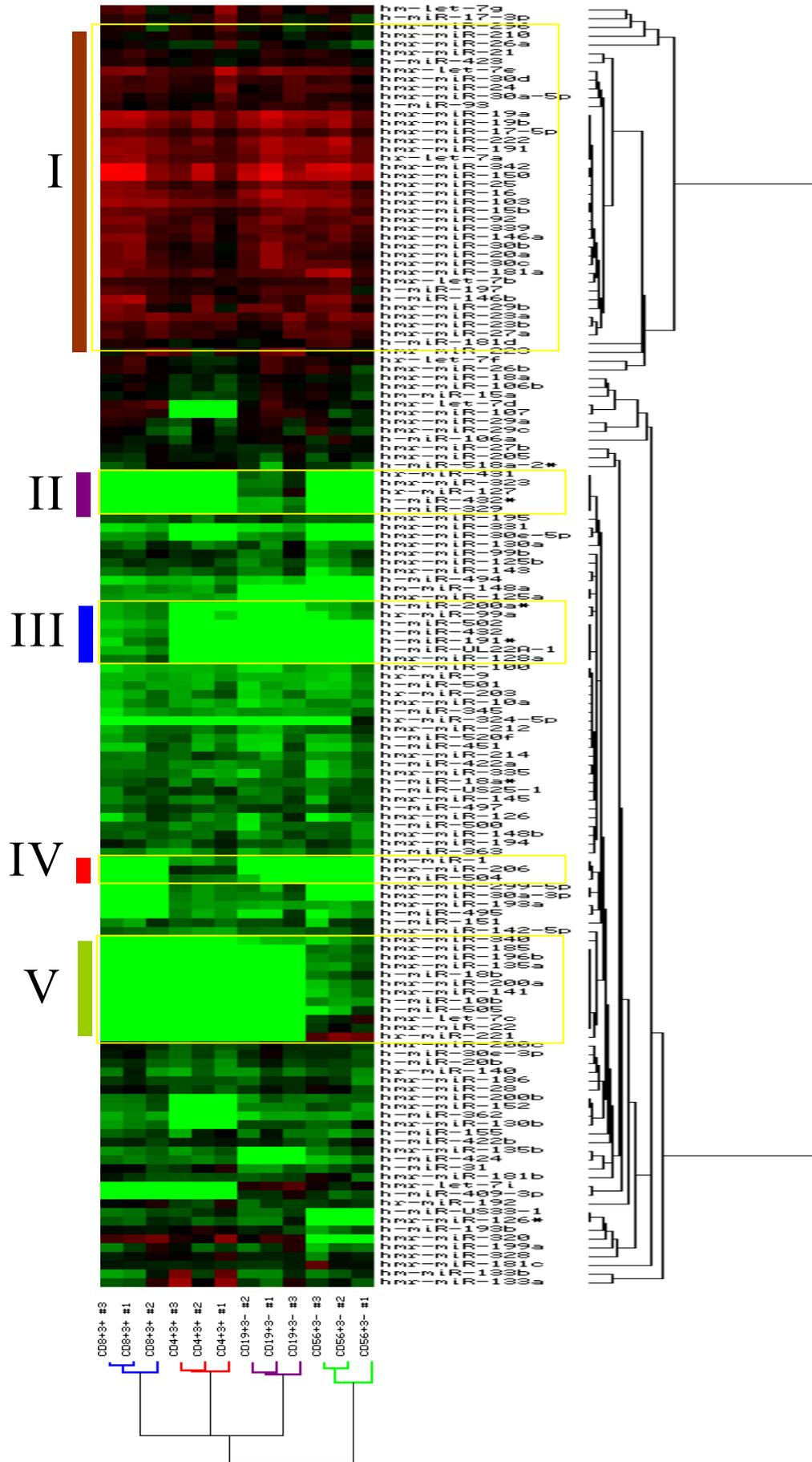
3.3.2.3 Lymphoide Zellpopulationen weisen nur schwache miRNA-Expressionsunterschiede auf

Um die miRNA-Expression in den Zellpopulationen der lymphoiden sowie myeloiden Zellreihen näher zu untersuchen, wurden die einzelnen Profile einer genaueren Betrachtung unterzogen. Für die Analyse primärer Lymphozyten aus peripherem Blut wurde das Expressionsprofil für jeweils drei Spender von zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺), T-Helferzellen (CD4⁺), B-Zellen (CD19⁺) und NK-Zellen (CD56⁺) unabhängig voneinander bestimmt und ein Stammbaum unter Verwendung normalisierter Datenpunkte angefertigt. Für diese Analyse wurden alle miRNAs berücksichtigt, die in mindestens einer Population detektierbar waren (Ct-Wert kleiner 31), so dass insgesamt 146 der 330 untersuchten miRNAs in die Auswertung einfließen. In Abb. 3.20 ist die Clusteranalyse für diese miRNAs von je drei Spendern pro Zellpopulation dargestellt.

Es wird hierbei deutlich, dass die miRNA-Expressionsprofile innerhalb der vier verschiedenen Lymphozytenpopulationen sehr ähnlich sind (Korrelation grösser 97%) und die jeweiligen Proben einer Lymphozytenart zusammen clustern. Überraschenderweise bilden die beiden T-Zelltypen (CD4- und CD8-positive Zellen) zusammen mit den B-Zellen auf der nächsthöheren Ebene ein gemeinsames Cluster, der von den NK-Zellen getrennt ist.

Abb. 3.20: miRNA-Expressionsprofil in lymphoiden Zellpopulationen. (Seite 94)

Korrelation der miRNA-Expression in Lymphozyten. Untersucht wurden B-Zellen (CD19⁺), NK-Zellen (CD56⁺), zytotoxische T-Zellen (CD8⁺) und T-Helfer-Zellen (CD4⁺) von jeweils drei unabhängigen Spendern und die ermittelten Expressionsdaten als dCT-Werte in die Clusteranalyse eingebracht. Nur exprimierte miRNAs (Ct-Wert kleiner Schwellenwert von 31) wurden verwendet. Gruppe I beinhaltet die in allen Lymphozyten exprimierten miRNAs, während die Zelltyp-spezifischen miRNAs in den Gruppen II bis V angeordnet sind.



Die Analyse der miRNAs ergab fünf distinkte Expressionsprofile. Gruppe I beinhaltet 96 miRNAs, welche in allen vier Lymphozytentypen nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.20). In den Gruppen II bis V sind die für den jeweiligen lymphozytären Zelltyp spezifischen miRNAs eingeordnet, welche in Abb. 3.21 vergrößert dargestellt sind.

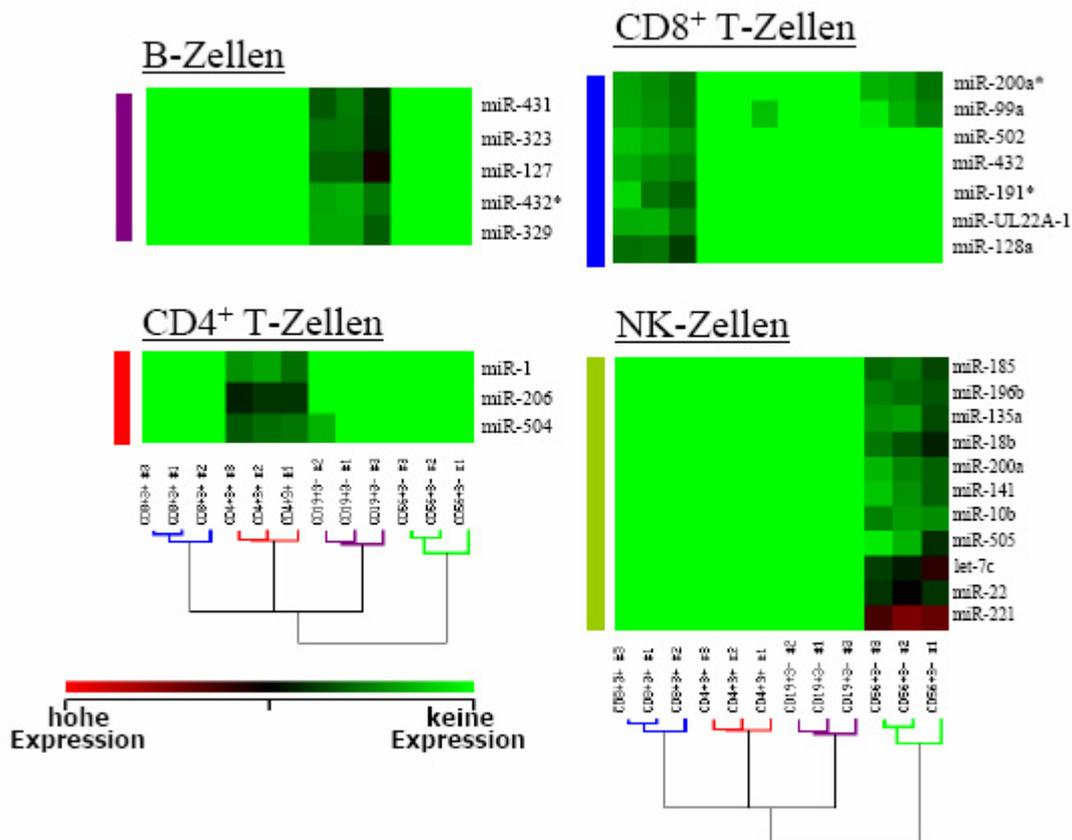


Abb. 3.21: Spezifische miRNA-Expression in lymphoiden Zellpopulationen.

Zelltyp-spezifische miRNAs, welche im Vergleich der verschiedenen Lymphozytenpopulationen zueinander exklusiv in nur einem lymphozytären Zelltyp gemessen werden konnten.

Der Vergleich der miRNA-Expression innerhalb der Lymphozyten ergab fünf spezifische miRNAs für B-Zellen (Cluster II) und sieben miRNAs, die nur in den CD8-positiven T-Zellen vorhanden waren (Cluster III). Die geringste Anzahl an exklusiven miRNAs wurde für CD4-positive T-Zellen gemessen (Cluster IV). Für diesen Lymphozytentyp konnten nur drei miRNAs bestimmt werden. Auffällig war, dass die CD4-positive T-Zellen die geringste

Gesamtanzahl an vorhandenen miRNAs im Vergleich zu den anderen Lymphozyten aufwiesen.

Die grösste Anzahl Zelltyp-spezifischer miRNAs konnte in NK-Zellen detektiert werden (grünes Cluster *V*). Für primäre NK-Zellen aus peripherem Blut wurden elf Zelltyp-spezifische miRNAs ermittelt. Korrelierend mit dieser Beobachtung konnte im Rahmen der Untersuchung lymphoider Zellen in NK-Zellen auch die höchste Anzahl an messbaren miRNA-Transkripten bestimmt werden (122 von 330 gemessenen miRNAs, 37%).

Im Falle der drei „NK-Zell-spezifischen“ miRNAs let7-a, miR-22 und miR-221 konnten starke Expressionsunterschiede relativ zu den anderen Lymphozytenarten gemessen werden (Abb. 3.21, grüne Datenpunkte im Vergleich zu den schwarzen und roten Farbkodierungen).

In Abb. 3.22 ist eine Übersicht aller miRNAs dargestellt, welche spezifisch in zwei verschiedenen Lymphozytenarten exprimiert (rot unterlegt) oder nicht exprimiert (grün) wurden.

	+	<i>CD4</i>	<i>CD8</i>	<i>CD19</i>	<i>CD56</i>
-					
<i>CD4</i>	Let-7d miR-107 miR-130b miR-152 miR-200b miR-362	miR-1 miR-206 miR-504	miR-125a miR-148a	miR-30a-3p miR-299a-5p	keine
<i>CD8</i>	Let-7i miR-340 miR-409-3p		miR-UL22A.1 miR-191+ miR-432 miR-502 miR-128a	miR-30e-5p miR-331	miR-99a miR-200+
<i>CD19</i>	miR-99a miR-200+		keine	miR-432+ miR-323 miR-431 miR-329 miR-127	Let-7i miR-340 miR-409-3p
<i>CD56</i>	miR-30e-5p miR-331	miR-30a-3p miR-299a-5p		miR-135b miR-424	miR-185; miR-196b miR-135a; miR-18b miR-200a; miR-141 miR-10b; miR22; miR-221 miR-505 miR-let7c

Abb. 3.22: miRNA-Expressionsprofil in lymphoiden Zellpopulationen.

Expressionsmuster in den möglichen Zelltypkombinationen. Die mit rot unterlegten Kästen repräsentieren die in der Kombination exprimierten miRNA, während eine grüne Farbung eine negative miRNA-Expression im entsprechenden Zelltyp wiedergibt.

Interessant erscheinen hierbei die beiden miRNAs miR-125a und miR-148a, die ausschliesslich in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimiert werden. Bei diesen miRNAs könnte es sich um solche handeln, die der Aufrechterhaltung des T-Zell-Status dienen.

Desweiteren ist die Expression von miR-99a und miR-200a* in den Zellpopulationen der CD8⁺- sowie CD56⁺- Lymphozyten hervorzuheben. Hierbei könnte es sich um miRNAs handeln, die eine Verknüpfung zwischen NK-Zellen und den NKT-Zellen, einer Subpopulation der CD8⁺ T-Zellen, widerspiegeln. Anzumerken ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass es keine miRNAs gibt, die ausschliesslich in der Kombination von CD4⁺ T-Zellen und NK-Zellen exprimiert werden.

3.3.2.4 miRNA-Profil in myeloiden Zellpopulationen

Die Expressionsanalyse myeloider Zellpopulationen wurde vergleichend zwischen primären, frisch isolierten Granulozyten (CD15+), Monozyten (CD14+) und Thrombozyten (CD61+) für jeweils drei unabhängige erwachsene Spender durchgeführt. In Abb. 3.23 sind die Vergleichsanalysen zwischen den frisch isolierten myeloiden Zelllinien dargestellt. Vergleichend zu den Auswertungen der lymphoiden Zellpopulationen fällt auf, dass die myeloiden Zelltypen ein grösseres miRNA-Spektrum aufwiesen. Von den 330 analysierten miRNAs konnten für insgesamt 212 miRNAs Transkripte nachgewiesen werden (Ct-Wert kleiner 31; entspricht 64,2%). Auch bei dieser Clusteranalyse ordneten sich die miRNAs in unterschiedlichen Mustern gemäß ihrer Zelltyp-abhängigen Expression an (Abb. 3.23). Korrelierend zur Clusteranalyse der Lymphozyten ordneten sich auch die drei analysierten Spender in Abhängigkeit ihres Zelltypes zusammen an. Anhand des Dendrogramms scheint es, dass Monozyten und Granulozyten ähnlicher zueinander sind als zu Thrombozyten.

Abb. 3.23: miRNA-Expressionsprofil in myeloiden Zellpopulationen. (Seite98)

Korrelation der miRNA-Expression in myeloiden Zellreihen. Untersucht wurden Monozyten (CD14+), Granulozyten (CD15+) und Thrombozyten (CD61+) von jeweils drei unabhängigen Spendern und die ermittelten Expressionsdaten als dCT-Werte in die Clusteranalyse eingebracht. Nur exprimierte miRNAs (Ct-Wert kleiner Schwellenwert von 31) wurden verwendet. Gruppe I beinhaltet die in allen myeloiden Zellen exprimierten miRNAs, während die Zelltyp-spezifischen miRNAs in den Gruppen II (Monozyten), III (Thrombozyten) und IV (Granulozyten) angeordnet sind.

Auch die Analyse der primären Zellpopulationen der myeloiden Seite der Hämatopoese ergab mehrere Expressionscluster. So konnte ein grosses Cluster ermittelt werden, welches alle miRNAs enthält, die eine gemeinsame Expression in den drei Zelltypen aufwiesen. Dieses Cluster I besteht aus 102 miRNAs. Demgegenüber zeigte die Analyse aber auch Cluster für Zelltyp-spezifische miRNAs, welche in Abb. 3.24 hervorgehoben sind.

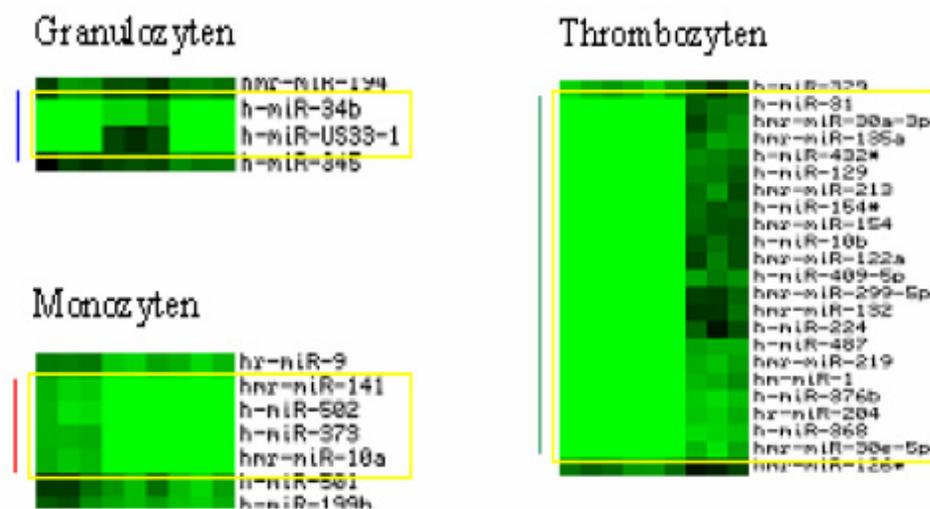


Abb. 3.24: Spezifische miRNA-Expression in myeloiden Zellpopulationen.

Zelltyp-spezifische miRNAs, welche im Vergleich der verschiedenen myeloiden Zellpopulationen zueinander exklusiv in nur einem myeloiden Zelltyp gemessen werden konnten.

So konnten für die Granulozyten die beiden Zelltyp-spezifische miRNAs miR-34b und miR-US33-1 bestimmt werden (Cluster IV). Während letztere eine verstärkte differentielle Genexpression im Vergleich zu den Monozyten und Thrombozyten aufweist, ist der Unterschied bei miR-34b eher gering. Eine Expression von miR-34b konnte sowohl in allen Stammzellpopulationen als auch stark in CD4⁺ Zellen gezeigt werden.

Das Cluster II repräsentiert die miRNAs, welche für Monozyten spezifisch detektiert wurden. Die vier miRNAs miR-10a, miR-141, miR-373 und miR-502 zeigten eine im Vergleich zu den anderen untersuchten myeloiden Zellen schwache Expression, was auch in der Clusteranalyse deutlich wird.

Die grösste Anzahl an Zell-spezifischen miRNAs wies die Population der Thrombozyten auf. Diese 23 Thrombozyten-exklusiven miRNAs sind im Cluster III zusammengefasst. Allerdings kann eine Verschiebung der gemessenen miRNAs für die Thrombozyten, wenn nicht ausgeschlossen, so doch minimiert werden, da die Anzahl an messbaren miRNAs auch in den Monozyten (134 messbare miRNAs bei Verwendung von 5000 Zellen) höher ist als in allen Zelllinien der Lymphopoese.

Statistische Analysen nach Venn zeigen im Vergleich zu den Lymphozyten eine höhere Anzahl an miRNAs, welche spezifisch für myeloide Zelltypen sind (102 miRNAs in myeloiden Zellen und 96 miRNAs in lymphoiden Zellen). Der Vergleich zwischen Monozyten und Thrombozyten ergab zusätzlich eine Schnittmenge bestehend aus 27 miRNAs, die sowohl in Monozyten als auch in den Plättchen exprimiert werden. Diese Schnittmenge ist Abb. 3.25 wiedergegeben, wobei einige der differentiell exprimierten miRNAs nur schwache Unterschiede zu den anderen myeloiden Zellarten aufweisen. Diese Daten deuten darauf hin, dass die miRNA-Ausgangsmenge, die aus der initial 10-fach höheren Thrombozytenzahl resultiert, durch die Normalisierung auf ein vergleichbares Niveau gebracht wurde.

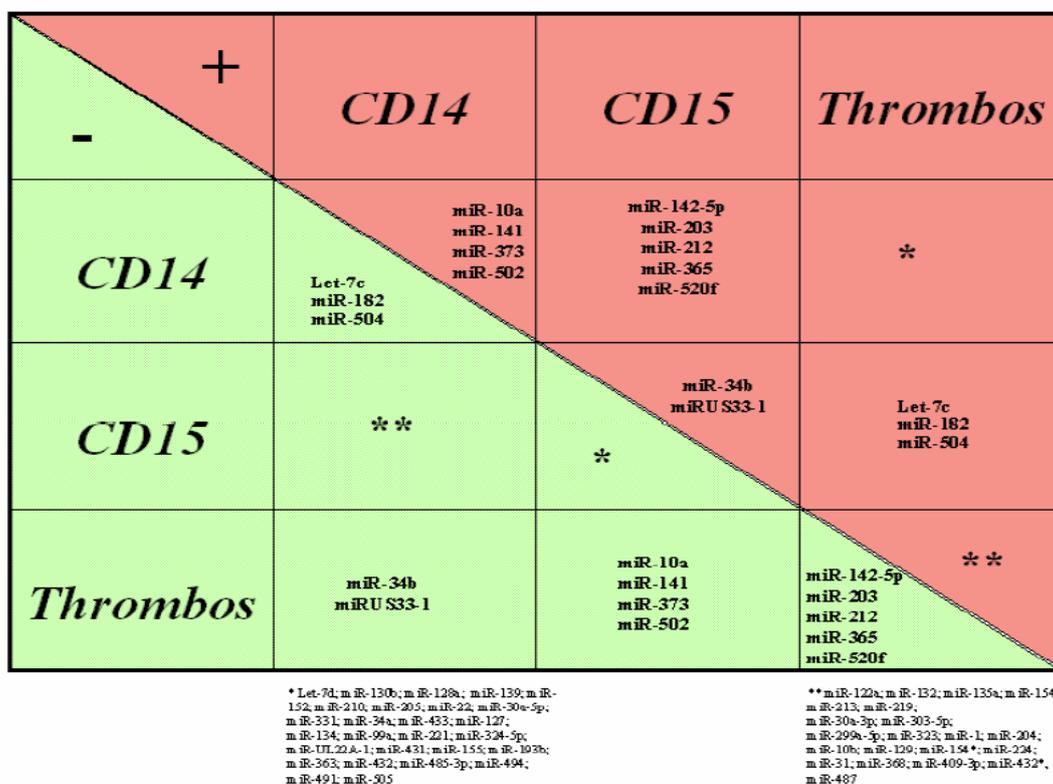


Abb. 3.25: miRNA-Expressionsprofil in myeloiden Zellpopulationen.

Expressionsmuster in den möglichen Zelltypkombinationen. Die mit rot unterlegten Kästen repräsentieren die in der Kombination exprimierten miRNA, während eine grüne Farbunterlegung eine negative miRNA-Expression im entsprechenden Zelltyp wiedergibt.

Interessanterweise ist die Expressionsstärke für fast alle miRNAs bei den Granulozyten wesentlich schwächer (Abb. 3.23). Die stark in Monozyten und Thrombozyten exprimierten Transkripte für miR-221, miR-22, miR-30a-5p, miR-324-5p, let-7d, miR-431 und miR-127 konnten in Granulozyten nicht gemessen werden.

3.3.2.5 Vergleich der miRNA-Profile in lymphoiden und myeloiden Zellen

In der Literatur wurden bereits verschiedene Hämatopoiese-spezifische miRNAs definiert; miR-142, miR-181a, miR155, miR-221, miR-222 und miR-223 (Übersichtsartikel: Kluiver et al., 2006).

Um die miRNAs zu ermitteln, die gemäss der Untersuchung frisch isolierter, primärer Zellen als Hämatopoiese-spezifische miRNAs eingestuft werden können, wurden die in Kap. 3.3.2.3 und 3.3.2.4 herausgearbeiteten miRNA-Profile einander gegenüber gestellt. Es wurden die miRNAs in die Auswertung einbezogen, die in mindestens einer der lymphoiden bzw. myeloiden Zellpopulationen messbar waren. Es konnten 29 miRNAs gemessen werden, die in der lymphoiden oder myeloiden Zelllinie der Hämatopoiese exprimiert sind (Abb. 3.26). Davon waren sieben miRNAs spezifisch für lymphoide Leukozyten, während die restlichen 22 miRNAs spezifisch in den myeloiden Blutzellen exprimiert waren.

miRNA	CD56	CD4	CD8	CD19	CD14	CD15	CD61
miR-100							
miR-127							
miR-134							
miR-135b							
miR-139							
miR-182							
miR-185							
miR-191*							
miR-196b							
miR-199b							
miR-200a*							
miR-30e-3p							
miR-30e-3p							
miR-30e-5p							
miR-31							
miR-324-5p							
miR-329							
miR-338							
miR-340							
miR-34a							
miR-365							
miR-431							
miR-433							
miR-485-3p							
miR-491							
miR-504							
miR-505							
miR-UL22A-1							
miR-US33-1							

Abb. 3.26: Hämatopoiese-spezifische miRNAs. Die für lymphoide Zellen spezifischen miRNAs sind hellgrau unterlegt, während in myeloiden Zellen angereicherte miRNAs dunkelgrau unterlegt sind.

3.3.3 MiRNA-Expressionsprofile in NK-Zellpopulationen

3.3.3.1 Spezifische miRNA-Expression in Subpopulationen von NK-Zellen aus peripherem Blut

In den vorangegangenen Analysen wurde gezeigt, dass sich die wichtigsten hämatopoietischen Zelltypen aufgrund ihrer miRNA-Profile signifikant voneinander unterscheiden. Um festzustellen, inwieweit sich auch nah verwandte Subpopulationen anhand ihrer miRNA-Expression unterscheiden lassen, wurden im folgenden die beiden wichtigsten NK-Zelltypen untersucht. Diese funktional unterschiedlichen NK-Zellsubpopulationen (siehe Einleitung) können anhand der differentiellen Expression von CD56 ($CD56^{Dim}$ und $CD56^{Bright}$) auf der Zelloberfläche unterschieden werden. Dazu wurden die NK-Zellen angereichert (MACS, siehe Kap. 2.10.3.7) und aufgrund ihrer Oberflächenmoleküle in einer durchflusszytometrischen Sortierung isoliert (s. Kap. 2.10.3.11). Das Sortierungsprotokoll für diese Aufreinigung und eine repräsentative DotBlot-Darstellung der resultierenden $CD56^{Bright}$ und $CD56^{Dim}$ NK-Populationen mit den für sie charakteristischen Oberflächenfärbungen ist in Abb. 3.27 dargestellt.

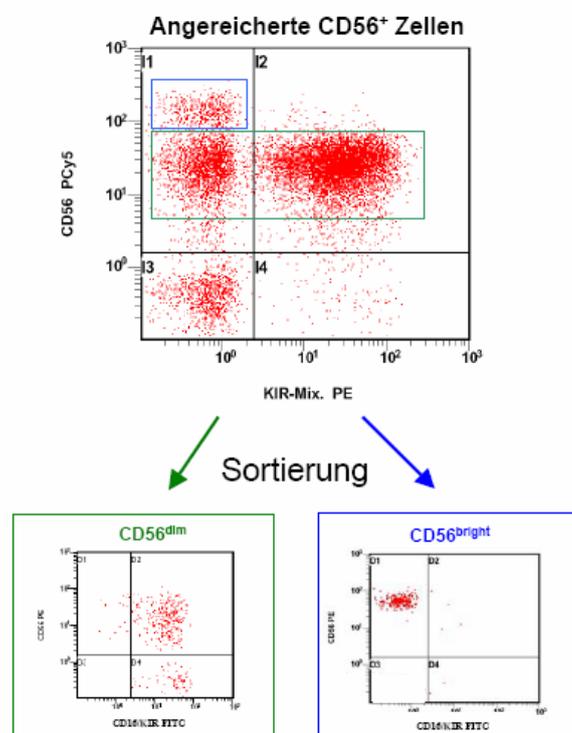


Abb. 3.27: Isolation von NK-Zellsubpopulationen.

Die NK-Zellen wurden zunächst mittels MACS-Technologie angereichert und dann aufgrund der Oberflächenmoleküle CD56, CD16 und KIR in ihre beiden Subtypen $CD56^{Dim}$ - (links) und $CD56^{Bright}$ -NK-Zellen unter Verwendung der Durchflusszytometrie sortiert.

Anschliessend wurden die Resultate der miRNA-Expressionsanalyse einem hierarchischem Clustering unterzogen (Kap. 2.12.6.1) und in Abb. 3.28 graphisch als dCt-Werte dargestellt. Der Vergleich zeigt, dass die beiden NK-Zellsubpopulationen CD56^{Dim} und CD56^{Bright} getrennt voneinander clustern (Abb. 3.28A), obwohl sie eine hohe Anzahl an gemeinsam exprimierten miRNAs besitzen. Dies wird durch die Scatterblotdarstellung in Abb. 3.28B verdeutlicht. Es konnten 120 miRNAs in beiden Subpopulationen gemessen werden, jedoch nur acht bzw. neun miRNAs, die spezifisch in CD56^{Bright}-Zellen bzw. CD56^{Dim}-Zellen exprimiert wurden. Die differentiell vorkommenden miRNAs weisen in der jeweiligen Subpopulation eine mittlere Expressionstärke auf, während sie in der anderen NK-Zellsubpopulation nicht exprimiert waren.

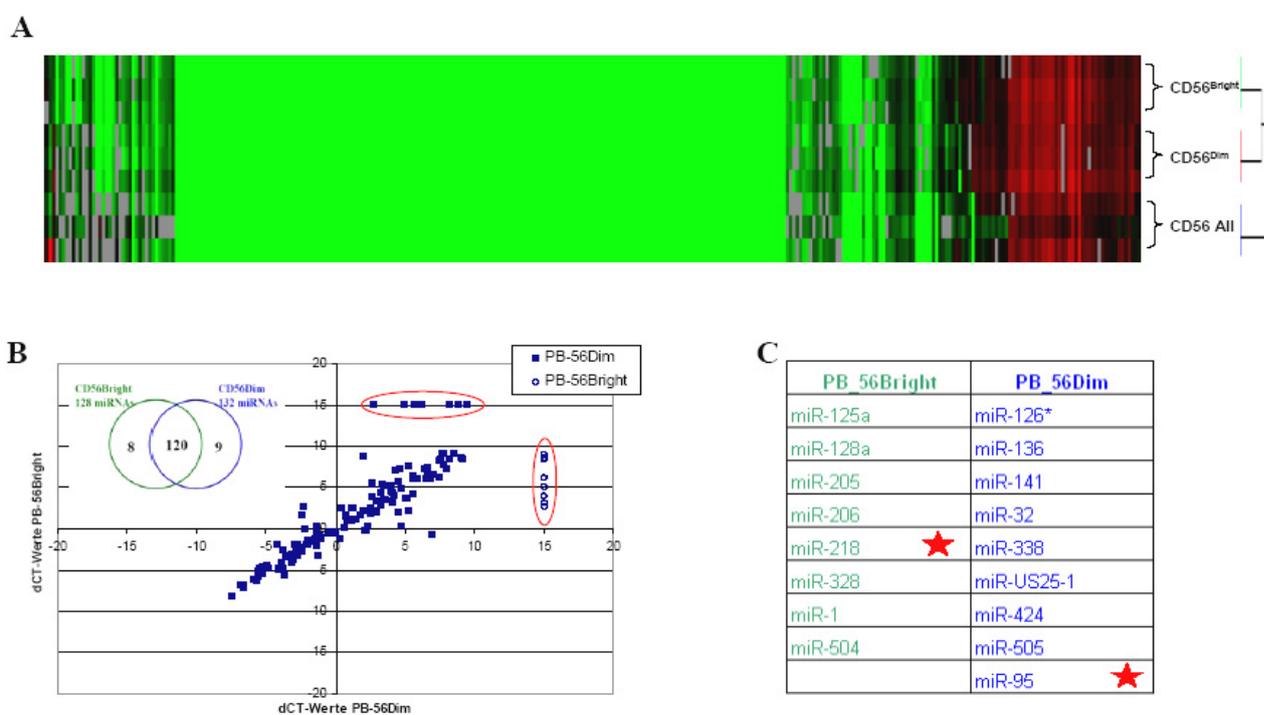


Abb. 3.28: miRNA-Expressionmuster in NK-Zellsubpopulationen aus dem peripheren Blut erwachsener Spender. A) Clusteranalyse der NK-Subpopulationen CD56^{Dim} und CD56^{Bright} von jeweils drei unabhängigen, gesunden Spendern. B) Korrelation der miRNA-Expression in den NK-Subpopulationen dargestellt durch einen Scatterblot. Die rot umkreisten Datenpunkte repräsentieren die für den entsprechenden NK-Zelltyp spezifischen miRNAs (offene Kreise = CD56^{Bright}, geschlossene Kreise = CD56^{Dim}). C) Liste der spezifischen miRNAs für CD56^{Bright}- und CD56^{Dim}-NK-Zellen. Rote Sterne symbolisieren miRNAs, die im Vergleich zu allen untersuchten Blutzellen exklusiv in der NK-Zellpopulation gemessen wurden.

Weiterführend wurde die Expression der 17 differentiell in den beiden NK-Zelltypen exprimierten miRNAs in allen analysierten hämatopoietischen Zelltypen untersucht, um die miRNAs herauszufiltern, die tatsächlich eine spezifische Expression für einen der NK-Subtypen besitzt. Dabei konnten für jede Zellpopulation nur je eine miRNA identifiziert werden. Exklusiv in CD56^{Bright} NK-Zellen wurde die miRNA miR-218 detektiert, während miR-95 nur in CD56^{Dim} NK-Zellen exprimiert gefunden wurden (Abb. 3.28C, markiert mit rotem Stern). Die in den CD56^{Dim} NK-Zellen gemessenen miRNAs miR-32 und miR-136 zeigten ebenfalls ein interessantes Expressionsprofil. Während miR-136 zusätzlich nur in hESCs und HSCs detektiert werden konnte, war eine Expression für miR-32 in hESCs sowie in allen Stadien der hämatopoietischen Stammzelle messbar. Dabei nahm die Transkriptmenge korrelierend zu Differenzierung der Zelle ab. Die gemessenen Expressionsstärke für miR-32 war dabei in CD56^{Dim} NK-Zellen vergleichbar zu determinierten HPCs (CD34⁺CD38⁺lin⁺).

3.3.3.2 Unterschiede in der miRNA-Expression in Subpopulationen zwischen neonatalen und adulten NK-Zellen

Um festzustellen, welchen Einfluss das physiologische Altern auf die miRNA-Expression in der Hämatopoese hat, wurden exemplarisch primäre NK-Zellen von Erwachsenen (32,3 Jahren) mit primären NK-Zellen, welche aus Nabelschnurblut (CB) gewonnen wurden, verglichen. Für neonatale NK-Zellen aus CB konnten insgesamt 153 miRNAs identifiziert werden, von denen 35 miRNAs exklusiv in neonatalen NK-Zellen exprimiert waren, während nur vier miRNAs in adulten NK-Zellen zu finden waren (Abb. 3.29A). Der Vergleich der miRNA-Profile aus PB und CB zeigt, dass die beiden Kurven parallel, wenn auch auf dem Expressionsniveau verschoben zueinander, verlaufen. Ein ähnliches Ergebnis zeigte die vergleichende Analyse der miRNA-Expression in neonatalen (155 miRNAs) vs. adulten (119 miRNAs) CD8⁺ T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Hierbei wurden andere neonatale Spender verwendet als in der oben angesprochenen Analyse der neonatalen NK-Zellen. Die Daten deuten darauf hin, dass eine beträchtliche Anzahl von miRNAs im peripheren, adulten Blut reprimiert werden.

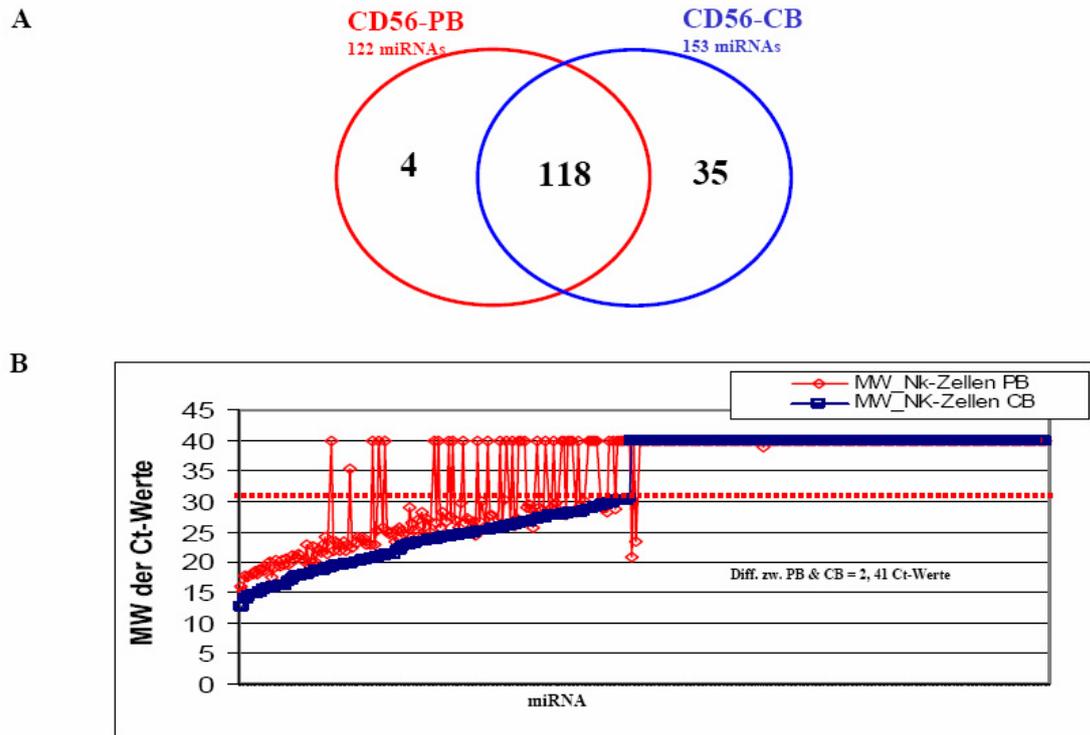


Abb. 3.29: miRNA-Expressionmuster in NK-Zellen aus peripheren Blut und Nabelschnurblut

A) Korrelation der miRNA-Expression in NK-Zellen aus peripheren (PB) und Nabelschnurblut (CB). Dargestellt sind die exprimierten miRNAs. B) Vergleichende Auftragung der Ct-Werte aus CB (blau) und PB (rote Kurve), sortiert nach zunehmender Stärke der Expression (Abnahme der Mittelwerte der Ct's).

Der Vergleich von primären NK-Zellen aus dem peripheren Blut (PB) und Nabelschnurblut (CB) zeigte, dass nicht nur eine unterschiedliche Anzahl an miRNAs in den beiden Blutquellen bestimmt werden konnte, sondern dass sich auch deren Expressionsmuster unterschieden. Diese Daten erwecken den Anschein, dass die Quelle der Blutzelle und das damit verbundene Alter der NK-Zellen einen Einfluss auf das miRNA-Expressionsmuster nimmt.

Weiterführend wurden die NK-Zellsubpopulationen aus CB im Vergleich zu den selben Zelltypen aus PB sowie hämatopoietischen Stammzellen verglichen. In der folgenden Abb. 3.30 ist die Ähnlichkeit der NK-Subpopulationen aus den beiden Blutsystemen im Vergleich zu hämatopoietischen Stammzellen als Clusteranalyse dargestellt.

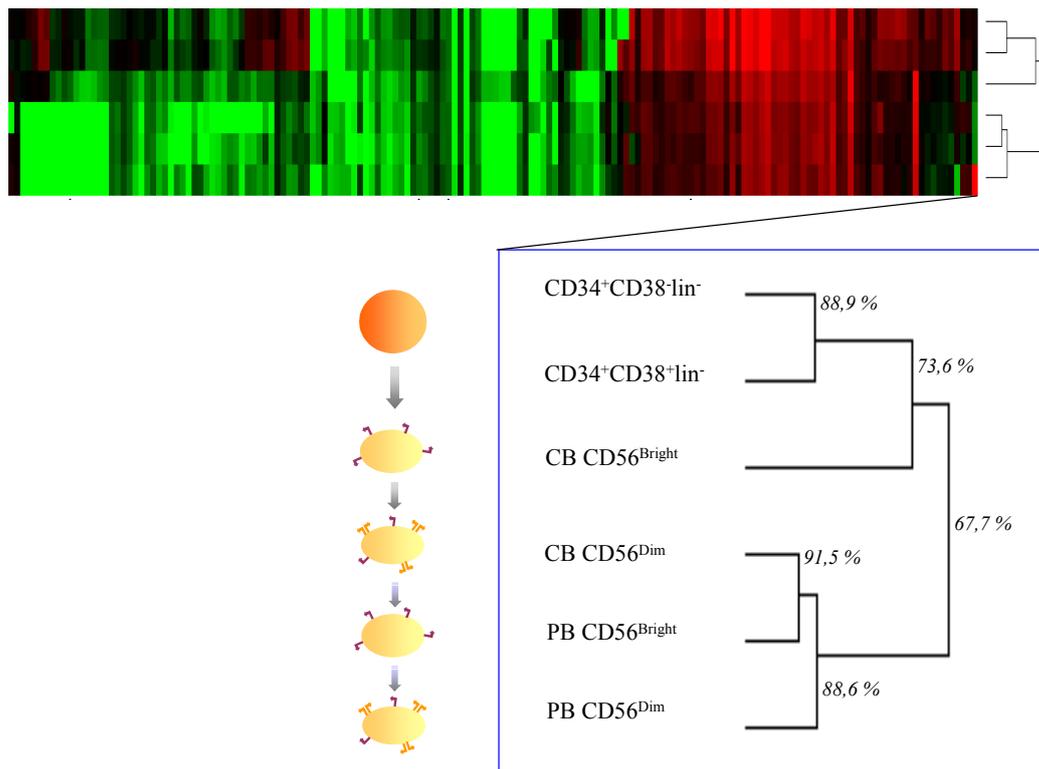


Abb. 3.30: miRNA-Signatur der NK-Zell-Subpopulationen aus peripheren Blut und Nabelschnurblut in Korrelation zu hämatopoietischen Stammzellen. Die hämatopoietische Stammzelle (oberste Zelle) weist keinen Rezeptor für CD56 (lila Struktur) und KIR (orange Struktur) auf, während CD56^{Bright} eine starke Oberflächenexpression für CD56 besitzt. CD56^{Dim}-NK-Zellen exprimieren sowohl CD56 als auch KIR auf ihrer Zelloberfläche.

Es wird deutlich, dass sich die untersuchten NK-Zelltypen in zwei Gruppen unterteilen und dass CD56^{Bright}-Zellen aus dem Nabelschnurblut in ihrem miRNA-Profil die grösste Ähnlichkeit zu den hämatopoietischen Stammzellpopulationen HSC und HPC haben. Dabei wird von den NK-Zellen eine zu den hämatopoietischen Stammzellen vergleichbare Menge an miRNAs exprimiert, deren Transkriptmenge jedoch in den CD56^{Bright}-Zellen erniedrigt ist. Die CD56^{Dim}-Zellen aus PB und CB ordneten sich getrennt an. Interessanterweise zeigten die CD56^{Dim} NK-Zellen aus dem Nabelschnurblut und die CD56^{Bright} NK-Fraktion des peripheren Blutes eine grosse Ähnlichkeit (91,5 %), so dass aufgrund der miRNA-Signatur vermutet werden kann, dass diese beiden Zelltypen einen ähnlichen Entwicklungsstauts aufweisen. Den differenziertesten Zustand der NK-Zellen repräsentiert die CD56^{Dim}-Zelle aus dem peripheren Blutssystem eines Erwachsenen.

Während sich die beiden NK-Unterpopulationen CD56^{Bright} und CD56^{Dim} im peripheren Blut in ihrem miRNA-Profil annähern, scheint es gravierendere Unterschiede zwischen diesen beiden NK-Zelltypen im Nabelschnurblut zu geben. So zeigten NK-Zellen aus dem CB nicht nur eine allgemein erhöhte Anzahl an exprimierten miRNAs, sondern konnte auch eine sehr viel grössere Menge an CD56^{Bright}-spezifischen miRNAs in Zellen des Nabelschnurblutes gemessen werden. Deshalb wurden die miRNA-Signaturen der CD56^{Bright}-Subpopulationen aus PB und CB detaillierter miteinander verglichen.

Der bereits erwähnte Unterschied zwischen den beiden Populationen aus zwei verschiedenen Blutsystemen wurde in der statistischen Analyse bestätigt (Abb. 3.31, Venndiagramm).

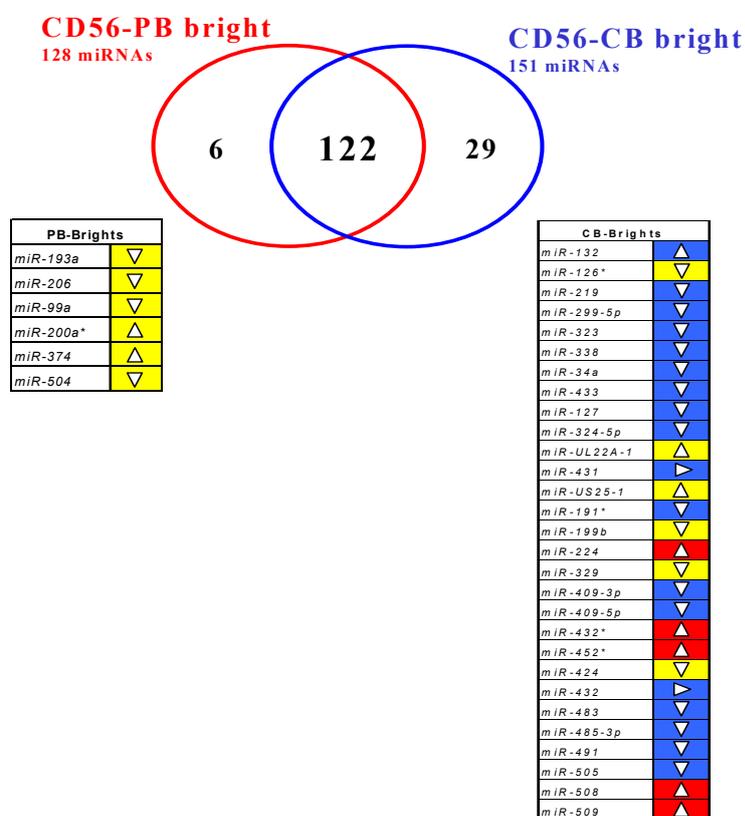


Abb. 3.31: Korrelation der miRNA-Signatur der CD56^{Bright} NK-Zellen aus peripherem Blut und Nabelschnurblut. In den Tabellen sind die miRNAs gesondert dargestellt, die nur in einer der Populationen gemessen werden konnten (PB = peripheres Blut; CB = Cord blood). Blau steht dabei für miRNAs, für die neben einer Expression in NK-Zellen auch Transkripte in hämatopoietischen Stammzellen zu messen waren, während gelbe Kästchen eine Expression in anderen primären Zelltypen wiedergeben. Die rote Unterlegung kodiert für eine exklusive miRNA-Expression in CD56^{Bright}-NKs aus CB. Die eingezeichneten Pfeile zeigen die Expressionsveränderung im Vergleich zu HSCs an. Die Expression wurde in mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt.

Die Schnittmenge zwischen den CD56^{Bright}-Zellen Erwachsener (PB) und Neugeborener (CB) umfasste 122 miRNAs. Für CD56^{Bright}-Zellen aus PB konnten nur sechs miRNAs gemessen werden, die nicht in CD56^{Bright}-Zellen aus CB vorhanden waren. Während alle sechs dieser miRNAs auch in anderen primären hämatopoietischen Zellpopulationen messbar waren, konnte von drei keine Expression in hämatopoietischen Stammzellen bestimmt werden (miR-200a*, miR-206 und miR-374). Besonders auffällig war die Expression von miR-206 und miR-200a*, die im Vergleich zu den CD56^{Bright}-Zellen nur noch in CD4-positiven T-Zellen bzw. CD8-positiven T-Zellen nachgewiesen werden konnten. Aufgrund dieses Expressionsmusters handelt es sich bei diesen miRNAs wahrscheinlich um Lymphopoiese-spezifische Regulatoren.

Demgegenüber waren 29 miRNAs aus Nabelschnur-CD56^{Bright}-Zellen nicht im peripheren Blut nachweisbar. Neben fünf miRNAs, die im globalen Vergleich der hämatopoietischen Zelltypen als spezifisch für CD56^{Bright}-Zellen aus CB bestimmt werden (miR-224, miR-432*, miR-452*, miR-508 und miR-509), zeigten 18 der 29 miRNAs neben CD56^{Bright}-Zellen aus CB nur in hämatopoietisch primitiveren Zellen (HSC, HPC) eine Expression. Dies untermauert die bereits angeführte Vermutung, dass es sich bei den CD56^{Bright}-Zellen aus CB um einen primitiven, dem miRNA-Profil von HSC/HPC ähnlichen NK-Zelltyp handelt, der jedoch schon eine Determinierung erfahren hat, was mit einer zu beobachtenden Abnahme der Genexpression korreliert. 19 der 29 miRNAs zeigten eine statistisch signifikante, drastische Abnahme der Transkriptmenge im Vergleich zu den Blutstammzellen (entspricht 65,7%, in der Tabelle dargestellt durch die nach unten zeigenden Pfeile).

Weiterführend wurde auch für die CD56^{Dim} NK-Zellpopulationen ein Vergleich zwischen den beiden Blutquellen durchgeführt. Hierbei waren die Gesamtanzahlen der detektierten miRNAs sehr ähnlich (129 miRNA in CD56^{Dim}-Zellen aus peripheren Blut gegen 124 miRNAs dieses NK-Zelltyps aus Nabelschnurblut) und ergaben eine Schnittmenge an 113 gemeinschaftlich exprimierten miRNAs. Vergleiche der miRNA-Expression der NK-Zellen aus beiden Blutquellen mit anderen Blutzellen zeigten, dass fast alle dieser miRNAs auch in hämatopoietischen Zelltypen transkribiert wurden (Abb. 3.32, gelb unterlegte Kästchen). Neben drei NK-Zell-spezifischen miRNAs (miR-184, miR-218, miR-219 und miR-1) konnten für CD56^{Dim}-Zellen aus PB drei miRNAs (miR-136, miR-10b und miR-95) gemessen werden, die auch in hämatopoietischen Stammzellen exprimiert waren. Interessanterweise war eine Expression von miR-136 nur in HPCs zu messen, von miR-95 nur in dHPCs, während für miR-10b Transkripte in allen drei Stammzelltypen der Hämatopoiese gemessen werden

konnten. Die Expressionsstärke dieser miRNAs war in den NK-Zellen im Vergleich zu den Stammzellen reduziert, so dass eine regulatorische Funktion dieser miRNAs im Rahmen der Entwicklung primitiver Stammzellen zu reifen NK-Zellen vermutet werden kann.

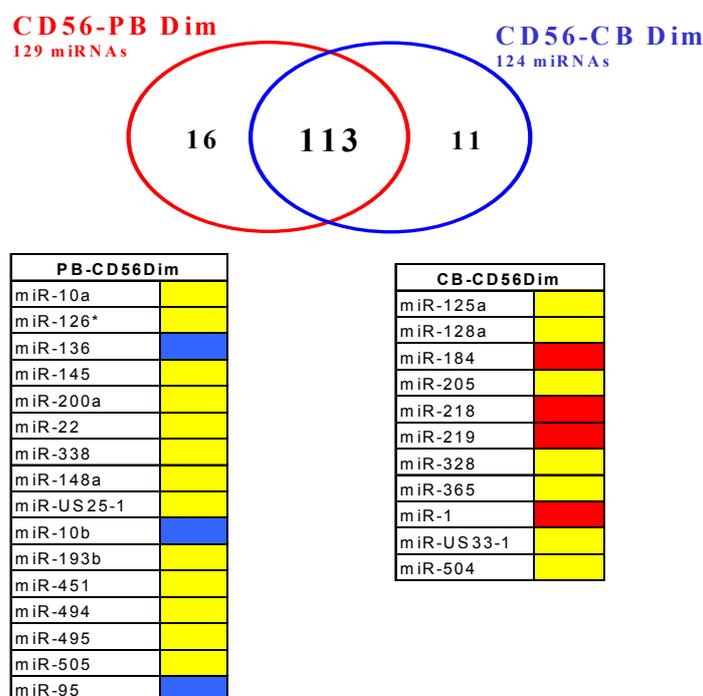


Abb. 3.32: miRNA-Signatur der CD56^{Dim} NK-Zellen aus peripheren Blut und Nabelschnurblut. In den Tabellen sind die miRNAs gesondert dargestellt, die nur in einer der Populationen gemessen werden konnten. Blau steht dabei für miRNAs, für die neben einer Expression in NK-Zellen auch Transkripte in hämatopoietischen Stammzellen zu messen waren, während gelbe Kästchen eine Expression in reifen Zellen wiedergibt. Die rote Unterlegung kodiert für eine exklusive Expression in NK-Zellen unabhängig von der Blutquelle. Die Expression wurde in mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt.

3.3.3.3 Änderung der miRNA-Expression in primären NK-Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen

Wie zuvor beschrieben, konnten sowohl in NK-Zellen aus dem peripheren Blutsystem als auch im Nabelschnurblut miRNAs mit einem speziellen Expressionsmuster in den NK-Zellsubpopulationen herausgefiltert werden. Für die CD56^{Bright} NK-Zellen waren diese die miRNAs miR-1 und miR-218. Um eine regulatorische Funktion der beiden miRNAs auf die CD56-Expressionsstärke in NK-Zellen untersuchen zu können, wurden NK-Zellen mittels

MACS-Technologie aus PB und CB isoliert und die Gesamt-NK-Zellfraktion für 14 Tage in einem IL2-haltigem Medium kultiviert. Sowohl in NK-Zellen aus PB als auch CB konnte eine Zunahme der Expression von miR-1 unter Kulturbedingungen nachgewiesen werden (Abb. 3.33).

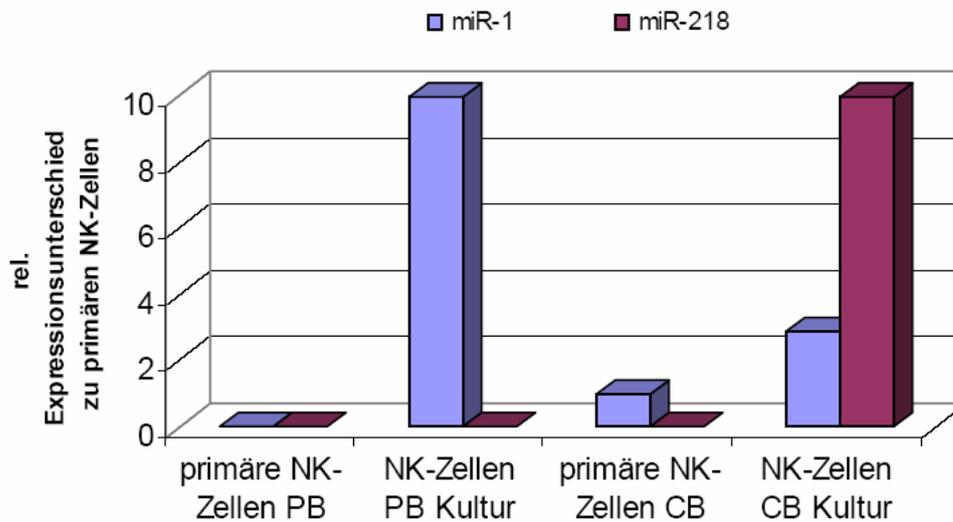


Abb. 3.33: miRNA-Expressionsänderung in kultivierten NK-Zellen aus peripheren Blut und Nabelschnurblut

A) Expression von miR-1 und miR-218 in primären und kultivierten NK aus peripherem Blut (PB) sowie Nabelschnurblut (CB).

In den kultivierten CB-Zellen war die Transkriptmenge um den Faktor 2,9 erhöht. Für miR-218 konnte nur für NK-Zellen aus CB nach 14-tägiger Kultur in IL2-haltigem Medium eine Expression nachgewiesen werden (Abb. 3.33, lila Balken). Demzufolge scheint es sich bei miR-218 nicht um einen spezifischen Regulator der CD56-Expression zu handeln.

Unter diesen Kulturbedingungen zeigen primäre NK-Zellen ($>90\%$ CD56^{dim}) einen schnellen und reproduzierbaren Anstieg der CD56 Expression von CD56^{dim} zu CD56^{bright} (Abb. 3.34A). Während in kultivierten NK-Zellen aus PB die Anzahl an exprimierten miRNAs im Vergleich zu primären NK-Zellen zunimmt (von 122 auf 138 miRNAs), reduziert sich deren Anzahl in kultivierten NK-Zellen aus Nabelschnurblut (von 153 zu 143 miRNAs).

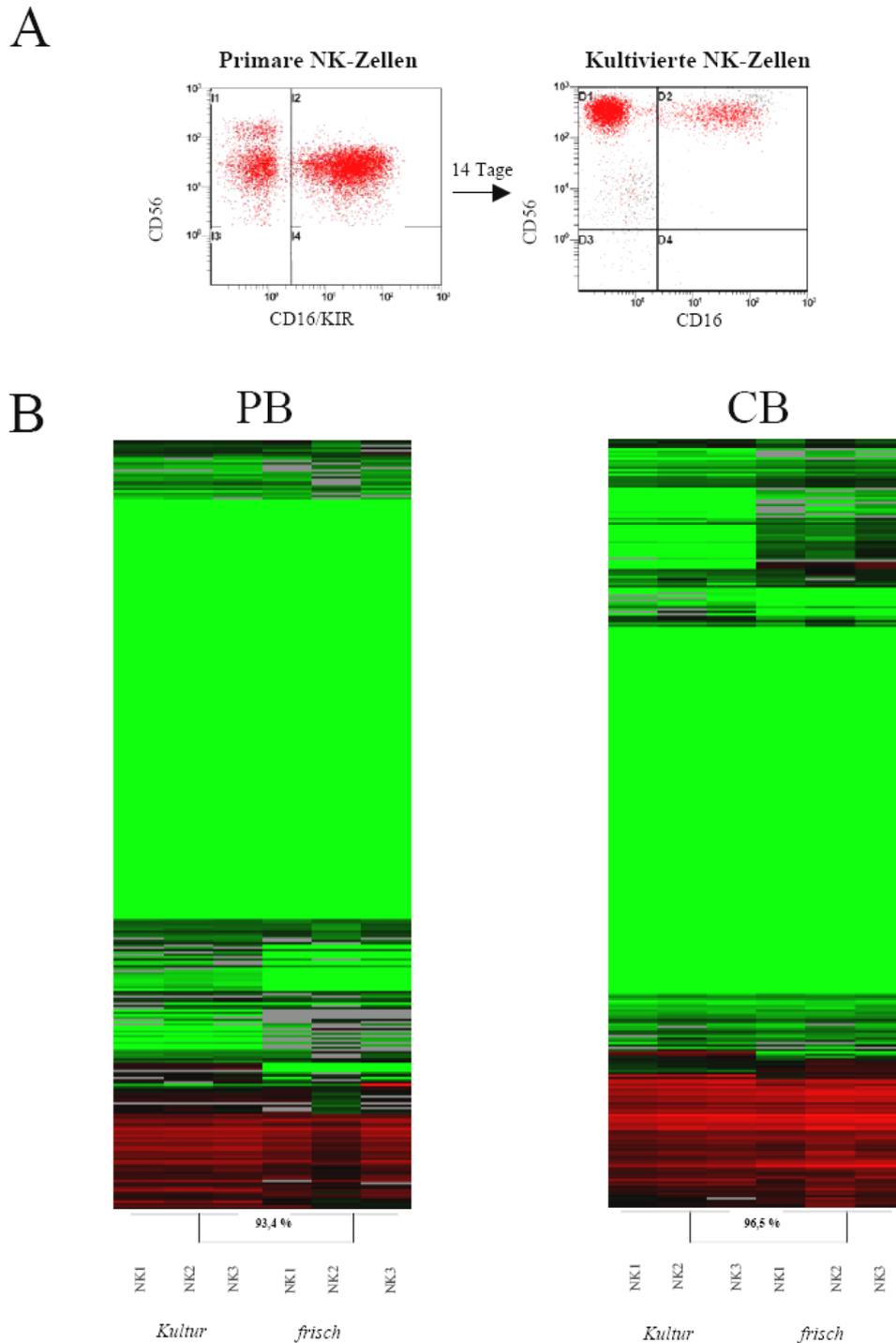


Abb. 3.34: miRNA-Signatur in kultivierten NK-Zellen aus peripheren Blut und Nabelschnurblut
 A) CD56^{Bright} und CD56^{Dim}- NK-Zellsubsets in primären angereicherten peripheren NK-Zellen und nach 14 Tagen in Kultur. B) Clusteranalyse der miRNA-Expression primärer und kultivierter NK-Zellen aus peripheren Blut (links) und Nabelschnurblut (rechts).

Der überraschende und spezifische Rückgang der miRNA-Anzahl in stimulierten NK-Zellen aus Nabelschnurblut lässt sich u.a. dadurch erklären, dass viele der stammzellspezifischen miRNAs, die nur in CD56^{bright} NK-Zellen aus CB nicht aber aus PB exprimiert werden (siehe Abb. 3.34) offensichtlich unter Kulturbedingungen abgeschaltet wurden. In den NK-Zellen aus PB sind miRNAs, welche bereits in primären NK-Zellen detektierbar waren, unter Aktivierungsbedingungen erhöht exprimiert (stärkere Rotfärbung), während einige zuvor nicht transkribierte miRNA-Gene nach Stimulation eine schwache Expression aufzeigten. Demgegenüber wiesen miRNAs, die bereits in primären NK-Zellen aus CB identifiziert wurden, eine vergleichbare Transkriptmenge in kultivierten Zellen auf, während eine Reihe anderer miRNAs unter Kulturbedingungen ausgeschaltet wurden. Vielmehr ist die Expression dieser miRNAs ein Merkmal hämatopoietischer Stammzellen (Abb. 3.35). Dies macht deutlich, dass die primitiveren NK-Zellen des Nabelschnurblutes in Kultur eine Reifung erfahren, die mit dem Abschalten Stammzell-assoziiierter miRNA-Gene einhergeht.

miRNA	Expression
miR-494	Blue
miR-452*	Blue
miR-504	Orange
miR-409-5p	Blue
miR-520f	Yellow
miR-483	Blue
miR-219	Blue
miR-410	Blue
miR-432*	Blue
miR-32	Yellow
miR-495	Yellow
miR-433	Orange
miR-134	Orange
miR-126	Yellow
miR-139	Green
miR-432	Blue
miR-329	Yellow
miR-299-5p	Orange
miR-145	Yellow
miR-130a	Yellow
miR-485-3p	Orange
miR-323	Blue
miR-127	Blue
miR-409-3p	Blue

Abb. 3.35: miRNAs, die im Rahmen der *in vitro* Kultur neonataler NK-Zellen reprimiert werden.

Liste der miRNAs aus NK-Zellen, die nach 14-tägiger Kultur keine Expression mehr aufweisen. Blaue Kästen symbolisieren miRNAs, die in einer globalen miRNA-Genexpressionsanalyse zusätzlich nur in hämatopoietischen Stammzellen exprimiert waren. Orange Unterlegungen stellen eine zusätzliche Expression in myeloiden Zelltypen dar, während gelbe Kästen eine Expression in anderen adulten Blutzellen widerspiegeln.

Um näher zu untersuchen, mit welcher Kinetik sich die beobachteten Änderungen der miRNA-Expression in Kultur ändern, wurden zusätzliche Experimente mit Kurzzeit-kultivierten (12 h) NK-Zellen durchgeführt.

Anhand der Clusteranalyse wird deutlich, dass es nicht nur zwischen primären und kultivierten NK-Zellen Expressionsunterschiede gibt, sondern auch zwischen unterschiedlich lang kultivierten NK-Zellen. Während die Anzahl an gemessenen miRNAs in den über Nacht (üN)-kultivierten NK-Zellen zugenommen hat (von 153 auf 163), reduzierte sich die Anzahl im Rahmen einer 14-tägigen Kultur auf 143 miRNAs.

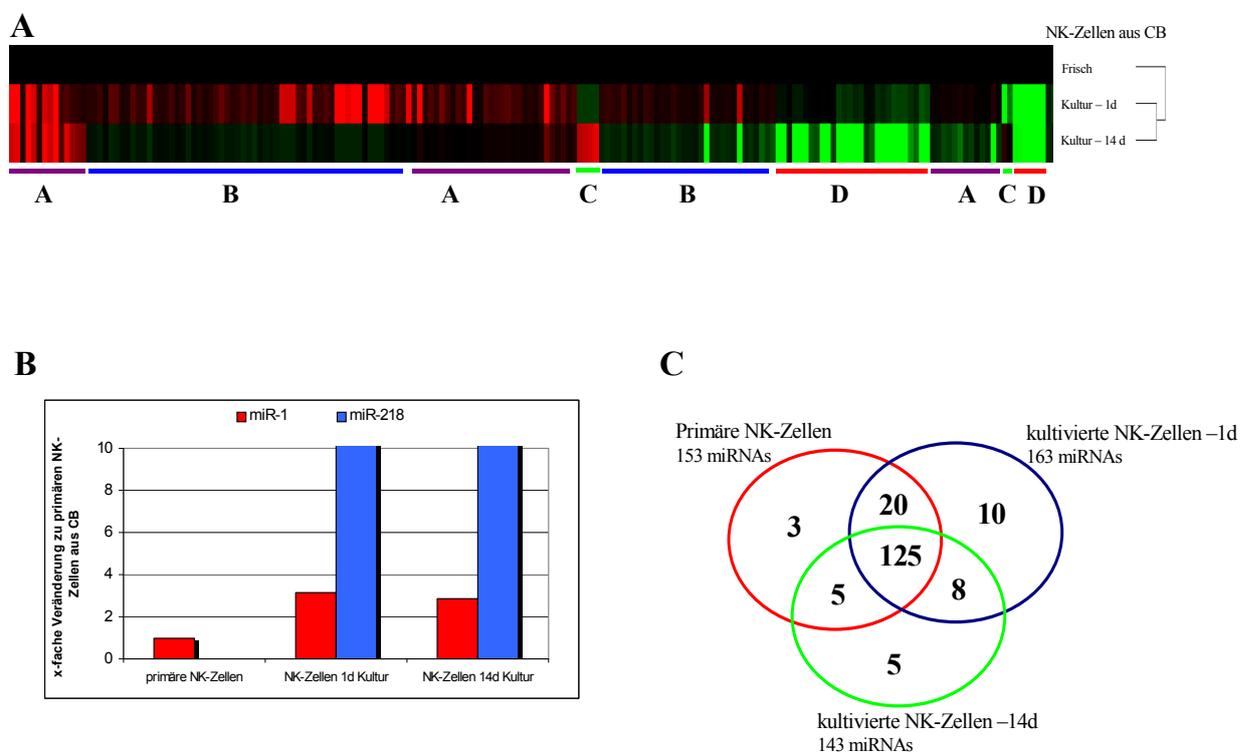


Abb. 3.36: miRNA-Signatur in kultivierten NK-Zellen aus Nabelschnurblut

A) Clusteranalyse zwischen primären und kultivierten NK-Zellen, normalisiert gegen nicht kultivierte NK-Zellen. B) Relative Expressionsunterschiede von miR-1 und miR-218 zu primären NK-Zellen. C) Korrelation der miRNA-Expression zwischen frischen, Kurzzeit-kultivierten (1 Tag) und Langzeit-kultivierten (3 Wochen) NK-Zellen; dargestellt als Venndiagramm. Es handelt sich um die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Aufgrund der resultierenden Expressionsmuster konnten vier Gruppen unterschieden werden (Abb. 3.36A bis D). Gruppe A beinhaltet die miRNAs, welche im Vergleich zu primären NK-Zellen in beiden Kulturzeitpunkten eine erhöhte Expressionsstärke aufwiesen (35 miRNAs inklusive miR-1 und miR-218, lila Balken). Gruppe B umfasst miRNAs, die nur in den

Kurzzeitkulturen eine verstärkte Expression aufzeigten (blaue Balken). Da NK-Zellen durch die Zugabe von IL2 aktiviert wurden, kann es sich bei diesen miRNAs um die handeln, die in den Zellzyklus involviert sind. Diese Vermutung wird durch eine verstärkte Expression von let-7a und miR-16 bestätigt. Gruppe C enthält die miRNAs, bei denen erst in fortgeschrittenen Stadien der Kultur eine erhöhte Transkriptmenge gemessen werden konnte (8 miRNAs, grüne Balken), während Gruppe D die miRNAs beinhaltet, die im Verlauf der Kultivierung eine erniedrigte Expression aufwiesen. Mit zunehmender Dauer der Kultur wurde aber die Expression dieser miRNA-Gene abgeschaltet.

3.3.3.5 Einfluss verschiedener Zytokine auf die miRNA-Expression von NK-Zellen

Die oben dargestellten Ergebnisse zeigten, dass die Stimulation von NK-Zellen mit Interleukin-2 eine rasche Änderung des miRNA-Profiles induziert.

Im folgenden Experiment wurde die Änderung des NK-Zell-spezifischen miRNA-Profiles durch Stimulation mit verschiedenen Zytokinen untersucht. Hierbei wurden NK-Zellen aus frischen Nabelschnurblut isoliert und für einen Tag unter Verwendung eines IL-2, IL-2/IL-10, IL-2/IL-15 oder IL-2/TGF- β supplementierten Medium kultiviert.

Unter allen Kulturbedingungen nahm die miRNA-Expression leicht zu (163 miRNAs für IL-2, 163 miRNAs für IL-2/IL-10, 162 miRNAs für IL-2/IL-15, 160 miRNAs für IL-2/TGF- β).

In der Clusteranalyse wird deutlich, dass insbesondere solche miRNAs, die bereits in unstimulierten NK-Zellen exprimiert wurden, unter den verschiedenen Kulturbedingungen eine Verstärkung der Expression erfuhren (Abb. 3.37).

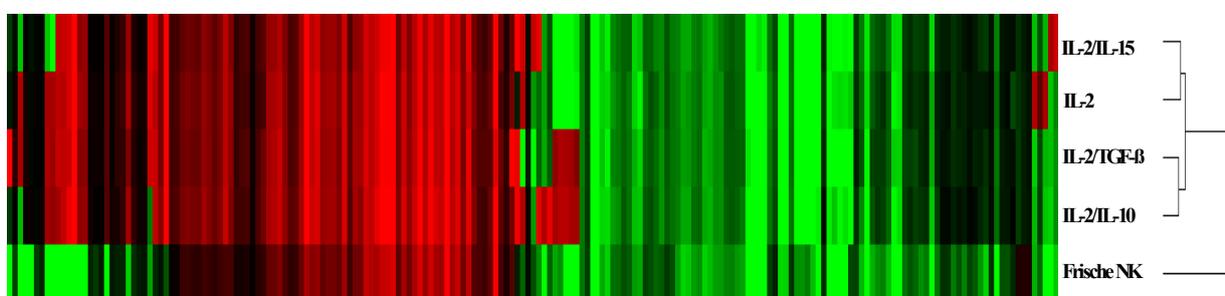


Abb. 3.37: Vergleich der miRNA-Expression zwischen primären und Kurzzeit-kultivierten NK-Zellen aus CB. Dargestellt sind Mittelwerte normalisierter Ct-Werte (dCT) von mindestens 2 unabhängigen Experimenten für frische, unstimulierte sowie stimulierte NK-Zellen.

Für 25 miRNAs konnte eine Zunahme der Expression unter allen vier Kulturbedingungen gezeigt werden (das entspricht 14%, rot unterlegter Teil des Diagramms, Abb. 3.38), die für alle vier Bedingungen nachweisbar und vergleichbar war und somit auf einen durch IL-2 verursachten Stimulus zurückzuführen sein kann.

Es wurden nur wenige miRNA-Gene durch die *in vitro* Kultur reprimiert (7 Stück, im grün unterlegten Teil).

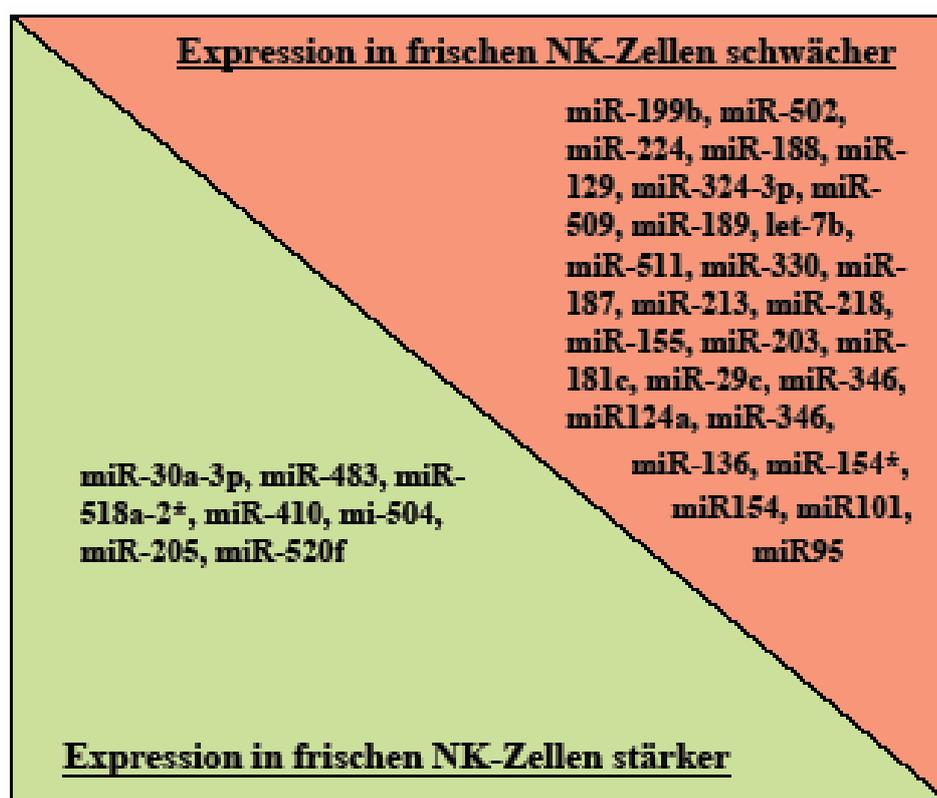


Abb. 3.38: Differentielle miRNA-Expression zwischen primären und Kurzzeit-kultivierten NK-Zellen aus CB. Die im Rahmen der Kultur verstärkt exprimierte miRNAs sind im roten Dreieck dargestellt, während die miRNAs, welche eine reduzierte Expression aufwiesen, im grünen Dreieck zu finden sind.

Die spezifischen Veränderungen der miRNA-Expression unter verschiedenen Kulturbedingungen sind im Abb. 3.39 wiedergegeben. Dabei zeigt der rotunterlegte Teil die in den verschiedenen Zytokinkombinationen gemessenen miRNAs an, während der grüne Teil miRNAs widerspiegelt, die in der entsprechenden Kombination nicht zu messen waren.

	+	<i>IL-2</i>	<i>IL-2/IL-10</i>	<i>IL-2/IL-15</i>	<i>IL-2/TGF-β</i>
-					
<i>IL-2</i>		miR-196b miR-219	keine	miR-503 miR-US-25-1	miR-34c miR-UL-112-1
<i>IL-2/IL-10</i>	miR-152 miR-UL-22A-1		miR-320 miR-489 miR-33	keine	miR-432* miR-487 miR-453 miR-149
<i>IL-2/IL-15</i>	miR-109	miR-503		miR-380-3p miR-368 miR-134 miR-331	miR-10a
<i>IL-2/TGF-β</i>	???	UL-112-1 miR-34c	miR-153		
	miR-320 miR-498 miR-33	miR-UL22-A-1 miR-152 miR-380 miR-368 miR-134	miR-219 miR-196b miR-320 miR-489 miR-33		miR-338 miR-206

Abb. 3.39: miRNA-Expression in kultivierten NK-Zellen aus CB.

MiRNA-Expressionsmuster unter Verwendung verschiedener Zytokinzusätze bei Kurzzeit-kultivierten NK-Zellen. Die mit rot unterlegten Kästen repräsentieren die in der Kombination exprimierte miRNA, während eine grüne Farbunterlegung eine negative miRNA-Expression im entsprechenden Zelltyp wiedergibt.

Hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang einige Expressionmuster: So konnten drei miRNAs detektiert werden, die sowohl in TGF- β - als auch IL-10-Kulturen eine Expression zeigten, jedoch nicht unter den anderen beiden Kulturbedingungen (miR-487, miR-453 und miR-149). Beide Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Immunsystems (Kontrolle der Proliferation und Differenzierung von Zellen) und besitzen ein ähnliches Wirkungsspektrum. Somit ist es nicht überraschend, dass miRNA gefunden wurden, die unter beiden *in vitro* Kulturen exprimiert wurden.

Weiterhin konnten aber auch IL-2- und TGF- β -spezifische miRNAs nachgewiesen werden. MiR-206 und miR-338 wurden ausschliesslich in TGF- β -kultivierten NK-Zellen identifiziert, während in IL-10 Kulturen die miRNAs miR-320, miR-489 und miR-33 spezifisch auftraten. Ein Augenmerk sollte auch auf die miR-338 gerichtet werden. Dieses miRNA-Gen ist auf Chromosom 17 in einem Intron des Gens *AATK* (apoptosis-associated tyrosine kinase) lokalisiert. Da TGF- β entweder über den SMAD oder DAXX pathway die Apoptose induzieren kann (Ref), ist eine Expression dieses *AAKT*-Gens und die daraus resultierenden Transkripte für miR-338 nicht verwunderlich. Die durch TGF- β veranlasste apoptotische

Wirkung auf die kultivierten NK-Zellen erklärt auch die geringere Anzahl an detektierten miRNAs im Vergleich zu den anderen Kulturbedingungen. Eine langfristige Kultur würde diese Tendenz wegen des fortschreitenden Zelltodes wahrscheinlich noch vergrößern.

Weiterhin wurde auch die Wirkung von IL-15 auf die miRNA-Expression untersucht. IL-15 ist ein strukturell dem IL-2 sehr ähnliches Zytokin. Es wird von Makrophagen in Folge einer Virusinfektion sekretiert und stimuliert (wie auch IL-2) NK-Zellen. Zusätzlich besitzt es eine anti-apoptotische Wirkung. Die unter IL-15-Bedingungen gemessenen miRNAs miR-331, miR-380, miR-368 und miR-134 könnten somit im Gegensatz zu TGF- β eine Verhinderung des programmierten Zelltodes unterstützen.

3.4 Vorhersage potentieller Zielgene (Target-Prediction)

3.4.1 Target-Gene für miR-1 und miR-218

In den oben dargestellten Ergebnissen sind viele miRNAs hervorgehoben worden, die eine differentielle Genexpression aufwiesen und somit als potentielle Regulatoren der hämatopoietischen Zelldifferenzierung fungieren könnten. Unter Verwendung der allgemein zugänglichen Algorithmen PicTar (Krek et al., 2005), TargetScan (Lewis et al., 2005; Lewis et al., 2003) oder miRanda (miRBase Targets, (Griffiths-Jones, 2004) können aufgrund von Sequenzhomologien im 3'UTR Zielgene identifiziert werden. Dabei können zwei unterschiedliche Ansätze angewandt werden, die in Abb. 3.40 verdeutlicht werden. Zum einen können für differentiell exprimierte miRNAs mögliche Ziel-mRNA-Gene ermittelt werden (linker Teil der Abbildung). Dabei werden oft hunderte von möglichen Interaktionspartnern angegeben, von denen bis dato nur sehr wenig experimentell bestätigt wurden. Der andere Analyseansatz geht von Mengenunterschieden bei mRNA-Transkripten und deren Proteinen aus und sucht für diese miRNAs, die durch eine Bindung im 3'UTR eine Translation hemmen könnten (rechter Abbildungsteil). Für die weiteren Untersuchungen potentieller Zielgene wurde miRGen (Megraw et al., 2007) verwendet. Diese im Internet freiverfügbare Software vereint die Algorithmen PicTar, TargetScan 4.0 und 5.0 und miRanda.

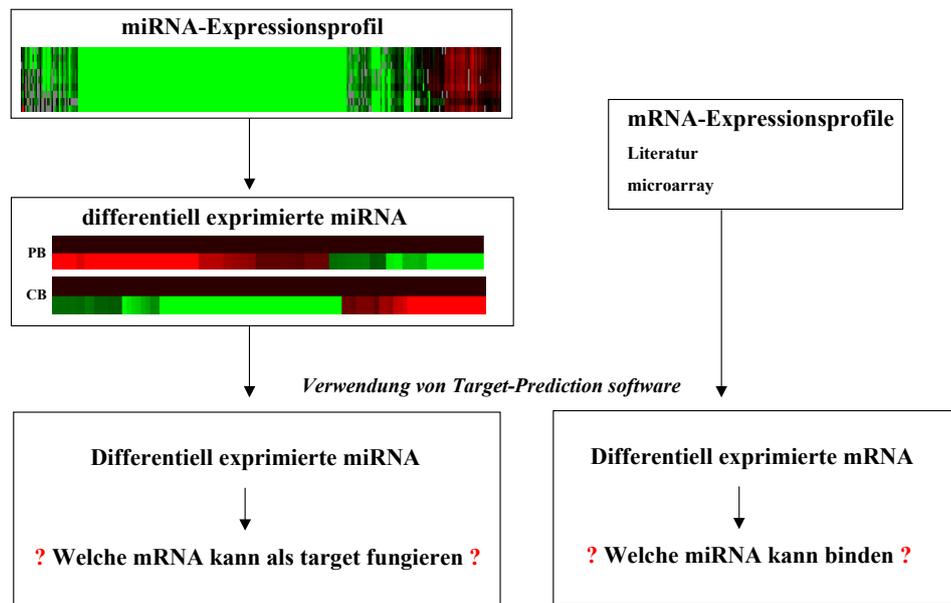


Abb. 3.40: Möglichkeiten der miRNA-Target-Prediction

In den zuvor dargestellten Ergebnisse konnte zwei miRNAs identifiziert werden, für die im Vergleich zu den unreifen NK-Zellen ($CD56^{\text{Bright}}CD16^{-}KIR^{-}$) in der reifen NK-Zellpopulation ($CD56^{\text{Dim}}CD16^{+}KIR^{+}$) keine Transkripte nachgewiesen werden konnten. Dies signifikante Expressionsunterschiede auf Proteinebene erlaubten die Vermutung, dass die beiden microRNAs miR-1 und miR-218 in die Regulation der Translation von CD56 (N-CAM), CD16 und/oder KIR involviert sind.

Da jedoch die Expressionsstärken der miRNAs reziprok zum Wirkungsmechanismus der miRNAs nachgewiesen wurden, ist eine direkte Interaktion von miR-1 und miR-218 mit dem Genprodukt von *NCAM* unwahrscheinlich. Deshalb wurde geschaut, ob die unterschiedliche Rezeptordichte auf den NK-Subtypen durch eine indirekte Inhibition bedingt ist. Sprich, ob ein für die Expression wichtiger Transkriptionsfaktor mit einer miRNA interagiert und dadurch die Expression von *NCAM* reduziert wird. Für *NCAM* sind in der Literatur zwei reprimierende Transkriptionsfaktoren bekannt. HES1 (hairy and enhancer of split) ist ein Repressor, der bei Überexpression die *NCAM*-abhängige Neuritendifferenzierung inhibiert (Jessen et al., 2003). Bei dem zweiten Repressor handelt es sich um BARX2, einem homeobox protein, dass mit der präferentiell an die Core-Sequenz CATTAA bindet. Edelmann konnte zeigen, dass BARX2 an *NCAM* bindet und so eine transkriptionelle Regulation der Promotoraktivität ausübt (Edelmann et al., 2000).

Die Expression von miR-218 wurde bis jetzt nur in neuronalen Zellen beobachtet. Sempere konnte zeigen, dass die Expressionsstärke dieser miRNA im Verlauf der neuronalen Differenzierung zunahm (Sempere et al., 2004).

Dagegen wurde die Expression von miR-1 nicht nur in murinen Gehirnen nachgewiesen (Mashima et al., 2007), sondern auch im Herzen. Verschiedenen Forscher konnten zeigen, dass diese miRNA eine wichtige Rolle in der Unterstützung der Myogenese (Chen et al., 2006) und Cardiogenese (Yang et al., 2007; Zhao et al., 2007) hat.

Augenscheinlich wurde somit eine erhöhte Expression dieser beiden kleinen RNAs in Gehirn- und Herzgewebe gefunden.

Bedenkt man weiterhin, dass es sich bei NCAM (*neural cell adhesion molecule*, CD56) um - wie der Name schon impliziert- einen Rezeptor handelt, dessen Protein in NK-Zellen, aber auch in neuronalen Zellen und Herzzellen exprimiert wird, so ist eine mögliche Schlussfolgerung, dass eine Korrelation zwischen den miRNAs und der Oberflächenexpression von CD56 besteht.

Eine Target-Prediction-Abfrage für miR-1 ergab 1041 (miRbase), 480 (TargetScan) und 535 (PicTar) protein-codierende Zielgene, während für miR-218 1051, 575 oder 551 mRNA-Interaktionspartner gefunden wurden. Leider war in keiner der Abfragen HES1 oder BARX2 aufgeführt und die Eigenanalyse des 3'-UTRs zeigte ebenfalls keine Sequenzhomologie mit einer der miRNAs. Auch CD16 oder die KIRs wurden nicht als mögliche Ziele aufgeführt. Die Möglichkeit einer Expressionsblockade durch die Inhibierung möglicher Repressoren der KIR wurde ebenfalls nicht ausser Acht gelassen. In unserem Labor von PD Dr. Uhrberg wurde für RUNX3 (*runt-related transcription factor 3*, AML2) eine Bindestelle in den KIR-Promotoren entdeckt (Trompeter et al., 2005). Allerdings konnte der Einfluss von RUNX3 auf die KIR-Expression bisher nicht bestätigt werden. Korrelierend dazu wurde in der Target-Prediction keine Interaktion von miR-1 oder miR-218 mit RUNX3 angezeigt.

Da diese Vorgehensweise keine Ergebnisse brachte, fokussierten wir uns auf die zweite Vorgehensweise, um mögliche Interaktionspartner herauszufiltern (Abb. 3.40, rechts). Dazu wurden die Abfrage nicht mit den differentiell exprimierten, offensichtlichen miRNAs durchgeführt, sondern für die NK-Zellmarker CD56, CD16 und KIR miRNAs gesucht, die mit ihrer seed-Sequenz (8 Nukleotide am 5'-Ende der miRNA, die die Bindung und somit Inhibition der Translation ermöglichen) an das 3'-Ende der Genprodukte binden können.

3.4.2 Target-miRNAs für NK-Oberflächenmarker

Um mögliche miRNAs zu finden, die durch eine direkte Bindung an die Oberflächenmarker der NK-Zellen deren Expressionsprofil ändern, wurde eine *in silico* Analyse für NCAM, CD16 und die KIRs unter Verwendung von miRGen durchgeführt.

Die Computerabfrage für NCAM ergab 48 miRNAs, von denen zwei miRNAs (miR-583 und miR-602) nicht gemessen werden konnten, weil sie nicht im 330-Multiplex enthalten waren. Für 24 miRNAs konnten für keine der NK-Zellpopulationen Transkripte nachgewiesen werden (Ct-Wert 40). Die verbliebenen 22 miRNA wurden normalisiert und ihre Expression ist in Abbildung 30 relative zur gemessenen Transkriptmenge in CD56^{Bright}-NK-Zellen aus peripheren Blut dargestellt. Es konnten sieben miRNAs bestimmt werden, die eine statistisch signifikante Expressionsänderung grösser/gleich einem Faktor von 2 aufwiesen (miR-152, miR-181c, miR-205, miR-296, miR-30a-5p, miR-505 und miR-9; Abb. 3.41, hervorgehoben durch rote Pfeile). Korrelierend zur erniedrigten NCAM-Expression in CD56^{Dim}-Zellen zeigte sich in diesen Zellen eine im Vergleich zu CD56^{Bright}-Zellen erhöhte Expression dieser miRNAs. Somit kann eine regulatorische Funktion einer oder mehrerer dieser miRNA auf die miRNA von NCAM vermutet werden.

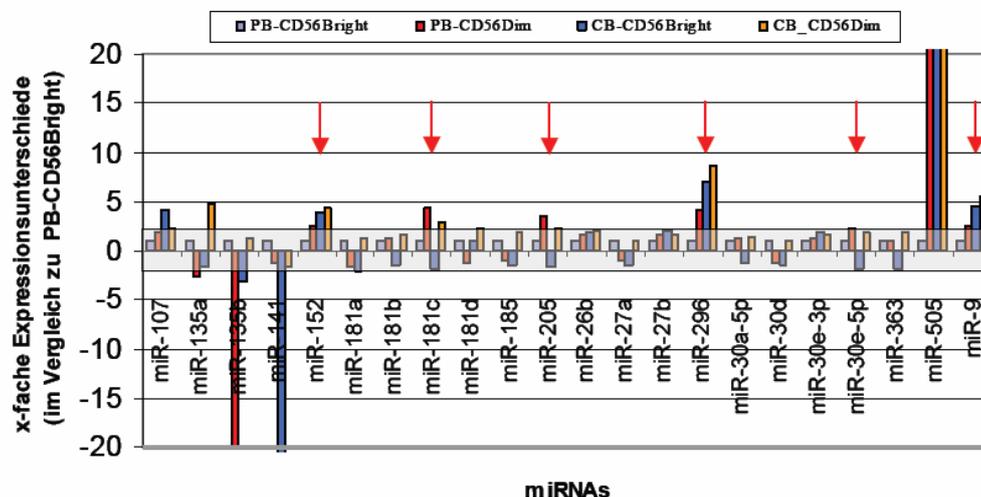


Abb. 3.41: miRNAs, die an CD56 (NCAM) binden können und deren Expressionsunterschiede in CD56^{Bright} und CD56^{Dim}-NK-Zellen aus PB und CB. Die relative Expression ist im Vergleich zu CD56^{Bright}-Zellen aus peripheren Blut, ermittelt aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, dargestellt. Der graue Kasten grenzt den Bereich ein, der nicht-signifikant veränderte miRNAs enthält. Die roten Pfeile zeigen die Kandidaten-miRNAs.

Wie bereits zuvor beschrieben, unterscheiden sich die beiden NK-Subpopulationen nicht nur in der Expressionsstärke von CD56. Auch die Oberflächenexpression von CD16 ist verschieden; so sind CD56^{Bright}-Zellen meist negativ für diesen low-affinity Rezeptor, während CD56^{Dim}-NKs eine starke CD16-Oberflächenfärbung in FACS-Analysen aufweisen.

Auch auf mRNA-Ebene konnten unter Verwendung von cDNA-Microarrays Unterschiede in der Transkriptmenge nachgewiesen werden (Hanna J, 2004; Wendt K, 2006). Um einen Einfluss von miRNAs auf dieses Molekül zu untersuchen, wurde auch hier eine Target-Prediction durchgeführt. Überraschenderweise ergab diese Abfrage nur vier mögliche miRNA-Moleküle; miR-133a, miR-133b, miR-145 und miR-598. Für die ersten drei konnten Expressionswerte bestimmt werden, die im Verhältnis zu CD56^{Dim}-NK-Zellen aus PB in Abb. 3.42 dargestellt sind (miR-598 war nicht im Assay enthalten). Wie der Grafik zu entnehmen ist, zeigte sowohl miR-133a als auch miR-133b eine erhöhte Expression in den CD56^{Bright}-NK-Zellen und kann demnach als Regulator der CD16-Expression in NK-Zellen angesehen werden. Es handelt sich bei diesen beiden miRNAs um das selbe Gen, das insgesamt auf drei verschiedenen genomischen Loci lokalisiert ist. Alle drei Gene liegen in Introns noch nicht funktional bekannter Gene, so dass ein Anstieg der Transkripte auch mit der Expression dieser unbekannteren Gene einhergehen kann.

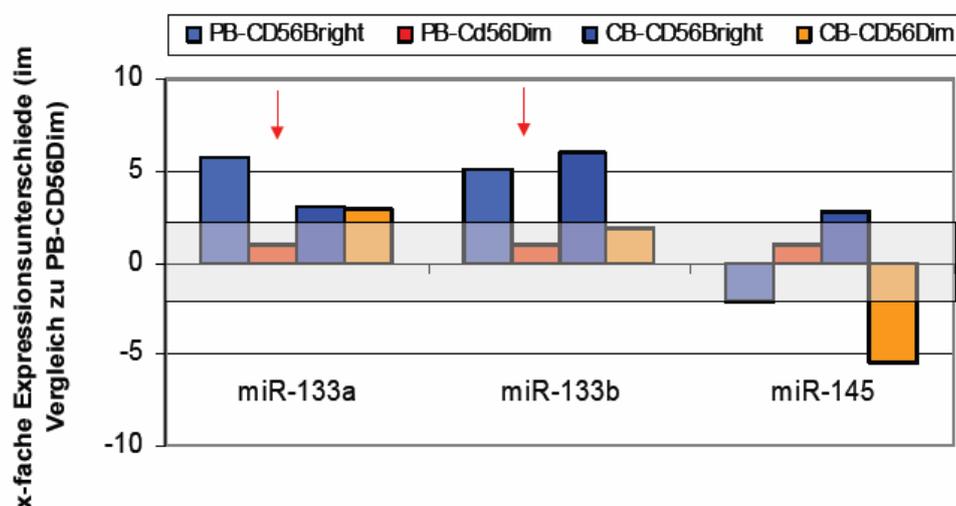


Abb. 3.42: miRNAs, die an CD16 binden können und deren Expressionsunterschiede in CD56^{Bright} und CD56^{Dim}-NK-Zellen aus PB und CB. Die relative Expression ist im Vergleich zu CD56^{Dim}-Zellen aus peripheren Blut, ermittelt aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, dargestellt. Der graue Kasten begrenzt den Bereich, der nicht-signifikant veränderte miRNAs enthält. Die roten Pfeile zeigen die Kandidaten-miRNAs.

Ein weiteres Kriterium, in dem sich die NK-Subpopulationen unterscheiden, ist eine nicht vorhandene Expression von inhibitorischen oder stimulatorischen KIRs auf der Zelloberfläche der unreifen CD56^{Bright}-NKs. Interessanterweise konnten sowohl Hanna (Hanna J, 2004) als auch Wendt (Wendt K, 2006) unabhängig von einander eine erhöhte Expression

von KIR2DL4 in den CD56^{Bright}-Zellen messen. KIR2DL4 ist der einzige Rezeptor aus der KIR-Familie, der auf allen NK-Zellen exprimiert wird, während alle anderen KIR klonal und nur auf den reifen CD56^{Dim}-Zellen exprimiert werden. Die Suche nach potentiellen miRNAs, die an den untranslatierten Bereich der *KIR*-Genprodukte binden können, konnten für KIR2DL4 28 miRNAs per Computeranalyse gefunden werden, während für alle anderen KIRs (aufgrund der starken Sequenzhomologie sind diese zusammengefasst) 80 verschiedene miRNAs angegeben wurden. Von den neun auswertbaren microRNAs (miR-146a, miR-146b, miR-16, miR-185, miR-214, miR-26a, miR-26b, miR-34b und miR491) konnte für keine der untersuchten miRNAs eine signifikante Änderung in der Transkriptmengen beobachtet werden (Abb. 3.43).

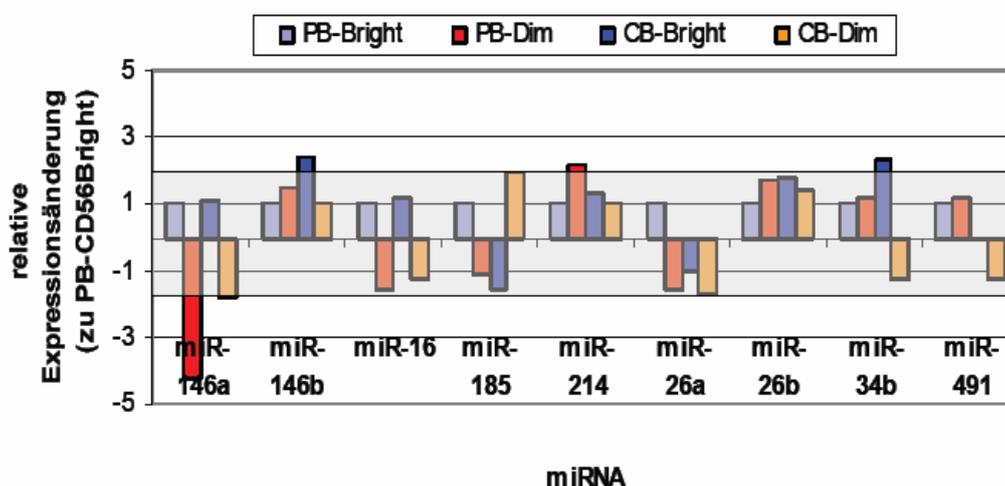


Abb. 3.43: miRNAs, die an mRNA von KIR2DL4 binden können und deren Expressionsunterschiede in CD56^{Bright} und CD56^{Dim}-NK-Zellen aus PB und CB. Die relative Expression ist im Vergleich zu CD56^{Bright}-Zellen aus peripheren Blut, ermittelt aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, dargestellt. Der graue Kasten grenzt den Bereich, der nicht-signifikant veränderte miRNAs enthält. Die roten Pfeile zeigen die Kandidaten-miRNAs.

Im Gegensatz zu KIR2DL4 kann auf CD56^{Bright} NK-Zellen keine Expression der restlichen KIR gemessen werden. Nur CD56^{Dim} NK-Zellen weisen Rezeptoren dieser Genfamilie auf ihrer Oberfläche auf. Die Target-Prediction ergab 80 mögliche miRNAs, die an die 3'-Enden diverser KIRs binden können, von denen 29 messbar waren (Abb. 3.44).

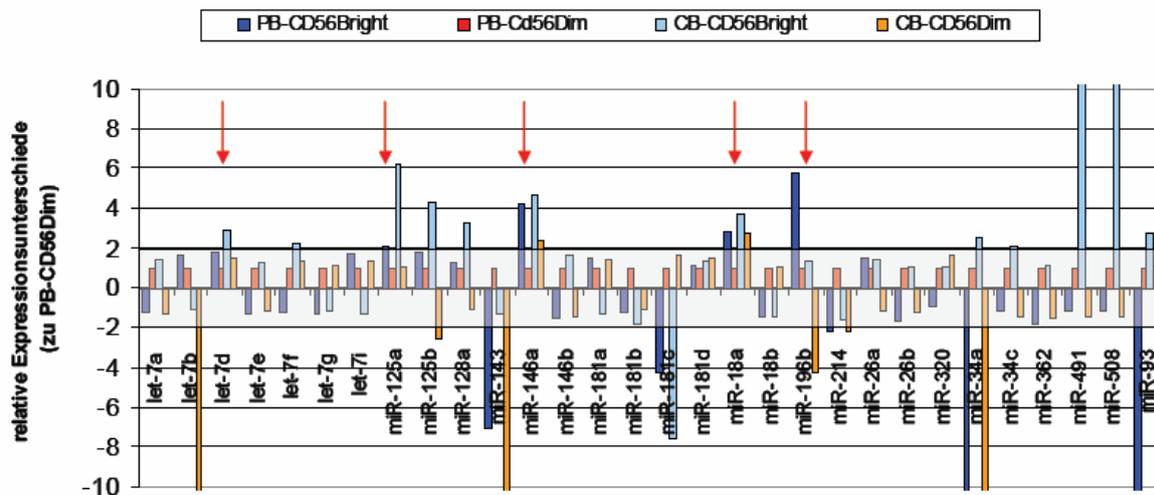


Abb. 3.44: miRNAs, die an mRNA von KIRs binden können und deren Expressionsunterschiede in CD56^{Bright} und CD56^{Dim}-NK-Zellen aus PB und CB. Die relative Expression ist im Vergleich zu CD56^{Dim}-Zellen aus peripheren Blut, ermittelt aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, dargestellt. Der graue Kasten grenzt den Bereich ein, der nicht-signifikant veränderte miRNAs enthält. Die roten Pfeile zeigen die Kandidaten-miRNAs.

Fünf der miRNAs (let-7d, miR-125a, miR-146a, miR-18a und miR-196a) zeigten in CD56^{Bright}-Zellen eine stärkere Expression als in CD56^{Dim} NKs, so dass eine Inhibition der Translation durch sie vermutet werden kann. Für alle wurde die Bindung an den 3'untranslatierten Bereich für die KIRs KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR3DL3, KIR2DL1, KIR2DS5, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR3DL2 und KIR2DS1 vorhergesagt. Dies ist nicht überraschend, da wie zuvor bereits erwähnt, die 3'-Bereiche der KIRs sehr homolog sind.

3.4.3 Target-miRNAs für NKG2D in NK-Zellen

In vitro Kulturen mit primären NK-Zellen zeigten einen Einfluss der Kulturbedingungen sowohl auf die *de novo* miRNA-Expression als auch auf den Expressionsspiegel der bereits in frischen NK-Zellen exprimierten miRNAs. So konnten für Kurzzeit-kultivierte NK-Zellen bereits nach 1 Tag Kultur starke Unterschiede detektiert werden.

NKG2D gehört zur Familie der NKG2-Gene, die mit MHC-Klasse-I-Molekülen interagieren und neben den KIRs einen weiteren Rezeptortyp auf NK-Zellen repräsentieren (Brostjan et al., 2000; Houchins et al., 1991). Liganden für humanes NKG2D sind MICA und MICB

(*MHC class I chain-related*); Moleküle, die mit den MHC-Klasse-I-Molekülen verwandt sind und deren Expression durch Stress induziert wird (Bauer et al., 1999). In diverse Studien konnten ein negativer Einfluss von TGF- β auf die Expression von NKG2D nachgewiesen werden (Lee et al., 2003, Song et al., 2006.) Unter Verwendung von NK-Zelllinie sowie NK-Zellklonen konnte in Gegenwart von TGF- β eine Abnahme von NKG2D sowohl auf Transkriptmenge als auch auf Proteinebenen gezeigt werden (Castriconi et al., 2003; Friese et al., 2004). Nina Graffmann aus unserer Arbeitsgruppe untersuchte im Rahmen ihrer Masterarbeit den Einfluss des durch TGF- β aktivierten Tumorsuppressorgens *RUNX3* auf NKG2D (Ito and Miyazono, 2003). Unter Verwendung der NK-Zelllinie NKL wurden NKG2D-Promotoranalysen mit intakten und mutierten Bindestellen für *RUNX3* durchgeführt. Die Resultate deuteten darauf hin, dass der reprimierende Einfluss von TGF- β auf NKG2D nicht durch *RUNX3* vermittelt wird (Graffmann, 2007). Diese Beobachtungen legten nahe, dass die Expressionsabnahme von NKG2D durch miRNAs vermittelt wird. Um den Einfluss von miRNAs zu untersuchen, wurde nach miRNAs gesucht, die an den 3'-Bereich von NKG2D binden können und dadurch die beschriebene Reprimierung vermitteln. Die Abfrage möglicher miRNAs ergab 47 Kandidaten, von denen 22 im 330-Multiplex-Assay nachgewiesen werden konnten. Diese Kandidaten sind in Abb. 3.45 im Vergleich zu frischen, nicht kultivierten NK-Zellen dargestellt. Daneben wurden die Expressionsprofile dieser miRNAs unter anderen Kulturbedingungen aufgetragen, um die Induktion der miRNA-Synthese durch andere Medienzusätze auszuschliessen.

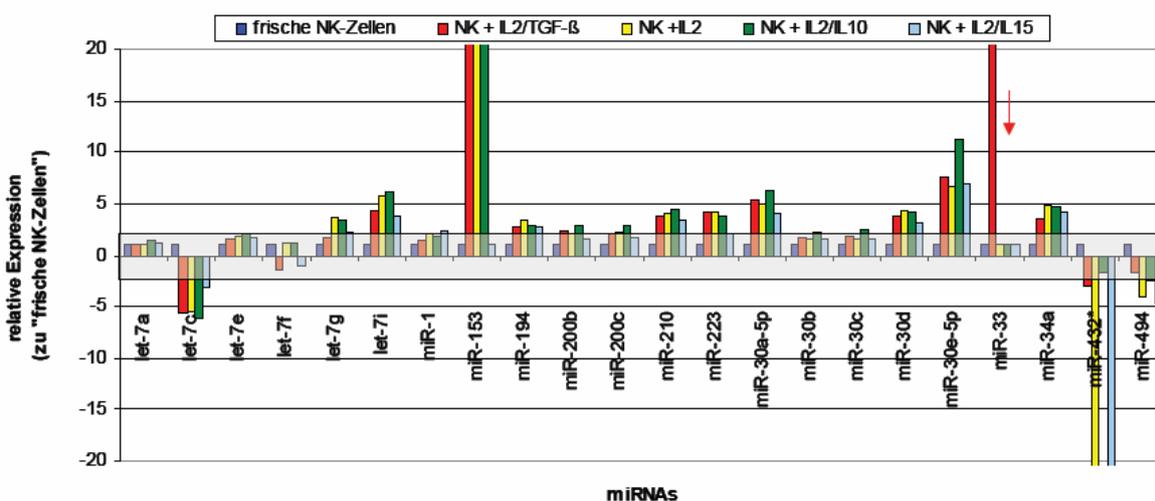


Abb. 3.45: Expressionsprofile von miRNA-Kandidaten, die an den 3'-UTR der mRNA von NKG2D binden können. Die relative Expression ist im Vergleich zu primären, nicht stimulierten NK-Zellen aus peripheren Blut, ermittelt aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten, dargestellt. Der grau Kasten grenzt den Bereich, der nicht-signifikant veränderte miRNAs enthält. Der rote Pfeil zeigt die Kandidaten-miRNAs an.

Wie der Graph zeigt, konnte für zehn miRNAs eine Expressionszunahme unter Kulturbedingungen nachgewiesen werden. Allerdings erhöhte sich die Transkriptmenge für neun miRNAs nicht nur in dem IL-2/TGF- β -haltigem Medium, sondern auch unter anderen Kulturbedingungen. Nur für miR-33 konnte eine signifikante Zunahme gemessen werden. Interessanterweise ist diese miRNA in den frischen NK-Zellen nicht exprimiert. Aus diesen Beobachtung kann geschlossen werden, dass die reprimierende Wirkung von TGF- β auf die Expression von NKG2D miRNA-vermittelt ist. Korrelierend dazu zeigten die Experimente von N. Graffmann eine Abnahme auf Proteinebene um 50 % nach 72 Stunden Kultur, während die Transkriptmenge um 35% reduziert war. Im Verlauf einer einwöchigen Inkubationsdauer mit TGF- β konnte nur noch auf 10% der NK-Zellen der Rezeptor auf der Oberfläche nachgewiesen werden, während immer noch 30% der mRNA in der Real-Time PCR zu messen war.

3.5 miRNA-Expression im Verlauf der neuronalen Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen

Die unter Verwendung hämatopoietischer Zellen erstellten Profile zeigten eine deutliche Abnahme der miRNA-Expression sowohl in Hinblick auf die Expressionsstärke als auch die Anzahl der transkribierten miRNA-Gene im Verlauf der Differenzierung. Es stellte sich die Frage, ob diese Beobachtung nur auf Zellen des Blutsystems beschränkt ist oder auch auf andere Differenzierungswege übertragbar ist.

Um diese Fragestellung anzugehen, wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Brüstle (Life and Brain, Bonn) ein ektodermales Differenzierungsmodell gewählt, bei dem humane ES-Zellen in neurale Vorläuferzellen ausdifferenziert wurden.

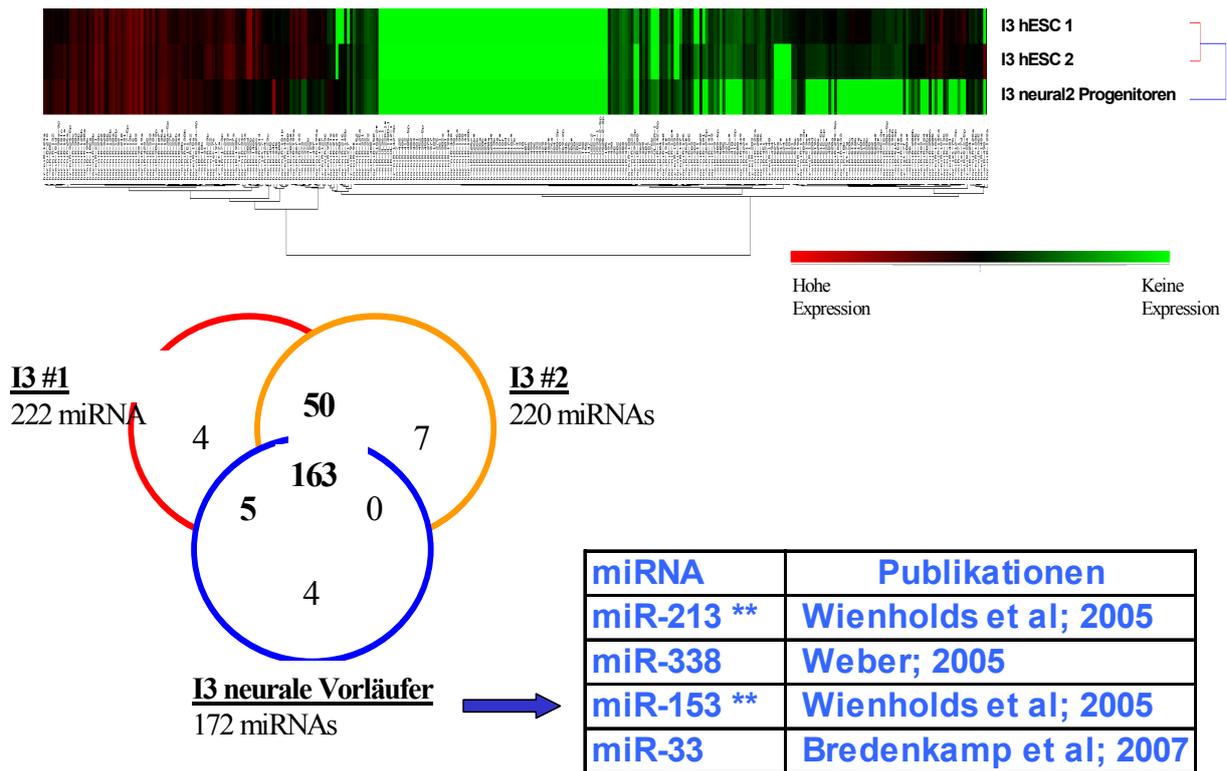


Abb. 3.46: miRNA-Expressionsprofile in hESC und neural-differenzierten hESCs der Zelllinie I3.

Wie in Abb. 3.46 dargestellt, wurden zwei unabhängige Linien der pluripotenten Stammzelllinie I3 untersucht. Wie erwartet, wiesen die miRNA-Profile der beiden I3-Linien nur wenige Unterschiede auf. Vergleicht man die miRNA-Profile von undifferenzierten mit neural-differenzierten Zellen derselben Zelllinie, so wird deutlich, dass die Expression im Rahmen der Reifung abnimmt (Abb. 3.46). Während in den undifferenzierten ES-Zellen 220 miRNAs nachgewiesen werden konnten, wurden in den neuralen Progenitoren nur noch 172 miRNAs detektiert. Die als „Gehirn-spezifisch“ beschriebene miR-124 wurde sowohl in undifferenzierten als auch differenzierten hESCs gemessen, allerdings nahm die Expression im Verlauf der Differenzierung zu. Für vier miRNAs wurden in hESCs keine Transkripte gemessen, während in neural differenzierten Zellen eine Expression detektiert wurde. Während die Rolle von miR-33 und miR-338 im Rahmen der neuralen Differenzierung bestätigt werden konnte (Bredenkamp et al., 2007; Weber, 2005), konnten die beiden anderen miRNAs miR-153 und miR-213 nur *in silico* als Kandidanten identifiziert werden (Wienholds et al., 2005). Insgesamt wurde auch im Rahmen der neuralen Differenzierung eine deutliche miRNA-Reduktion beobachtet.

4 *Diskussion*

Die Komplexität des Proteoms einer Zelle wird nicht ausschließlich durch - wie lange angenommen - die Expression Protein-kodierender Gene und das weitere Prozessieren der Expressionsprodukte aufrecht erhalten, sondern auch durch die regulatorische Funktion der kürzlich entdeckten microRNAs gesteuert (Lee and Ambros, 2001). Die Rolle der miRNAs als Modulatoren der Genexpression, vermittelt durch eine Inhibition der Translation einer Großzahl von Zielgenen, ist inzwischen vielfach beschrieben und akzeptiert worden (Übersichtsartikel: Bartel, 2004; Wernet, 2006). Vielen der veröffentlichten Studien ist zu entnehmen, dass dieser Regulationsmechanismus oftmals in die Kontrolle der Genexpression in bestimmten Differenzierungsstadien involviert ist. Dadurch wurde das Feld der miRNA-Biologie zu einem stark untersuchten Forschungsgebiet, da besonders in Hinblick auf die Ausbildung verschiedener Krankheitsbilder ein Einfluss dieser kleinen RNAs vermutet und eine starke Korrelation der miRNA-Expression zwischen gesundem und erkranktem Gewebe gezeigt werden konnte (Calin et al., 2004a; Calin et al., 2004b; Michael et al., 2003).

Der Einfluss der miRNAs auf die Hämatopoese konnte durch die Identifikation dreier muriner miRNAs gezeigt werden (Chen et al., 2004). Die Autoren beschrieben als erste die Expression der Hämatopoese-spezifischen miRNAs miR-142, miR-181a sowie miR-223 in B- und T-Zellen sowie in Monozyten, Granulozyten und Erythrozyten. Die Daten deuteten auf eine Gewebe-abhängige Expression im Verlauf der Differenzierung hämatopoietischer Zelltypen hin. Im Anschluss konnten auch in humanen Zellen Expressionsmuster verschiedener miRNAs in einzelnen Geweben nachgewiesen werden (Fazi et al., 2005; Garzon et al., 2006; Wu H, 2007). Das Labor von T. Tuschl veröffentlichte kürzlich miRNA-Expressionsprofile von über 200 verschiedenen murinen und humanen Zellpopulationen, welche mittels einer Klonierungsstrategie generiert wurden (Landgraf et al., 2007). Jedoch fehlt bis heute eine globale miRNA-Expressionsanalyse humaner hämatopoietischer Zellen, die eine quantitative Aussage der miRNA-Transkriptmenge auch in gering vorkommenden Subpopulationen erlaubt.

Aufgrund der fehlenden Sensitivität dieser Methoden existieren jedoch bis jetzt keine systematischen Analysen primärer hämatopoietischer Zelltypen, die vor allen im Fall der Stammzellpopulationen nur in geringer Frequenz isoliert werden können.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren daher folgende:

- 1) Etablierung einer geeigneten, sensitiven Methode zur Untersuchung der miRNA-Expression in humanen Blutzellen
- 2) Globale miRNA-Expressionsanalyse der verschiedenen hämatopoietischen Zellpopulationen im Verlauf der Hämatopoiese
- 3) Vergleich der miRNA-Signaturen humaner adulter Stammzellen und humaner embryonaler Stammzellen
- 4) Erstellen von miRNA-Profilen in Subpopulationen von Natürlichen Killerzellen aus peripherem Blut und Nabelschnurblut
- 5) Untersuchung des Einflusses einer *in vitro* Stimulation und Kultur auf das Expressionsprofil primärer Lymphozyten
- 6) Analyse der Änderung des miRNA-Profiles in *in vitro* Differenzierungen aus einem zweiten Keimblatt

Um eine Expressionsanalyse der miRNAs in verschiedensten humanen Zellpopulationen durchführen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein miRNA-Microarray entwickelt. Basierend auf der gewonnenen Erfahrung bei der Entwicklung eines DNA-Microarrays zur Untersuchung der globalen Genexpression von mRNA-Molekülen konnte eine miRNA-Plattform aufgebaut werden. In vielen Studien wurde diese Art der Expressionsanalyse von miRNAs zur Untersuchung diverser Zelltypen und/oder Zellstadien beschrieben (Barad et al., 2004; Calin et al., 2004a; Esau et al., 2004; Miska et al., 2004). Allerdings handelte es sich dabei zum grössten Teil um die Untersuchung von Material aus kultivierten Zellen oder kommerziell erhältlichen RNA-Mischungen, so dass das Ausgangsmaterial in ausreichender Menge zur Verfügung stand.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Zellen handelt es sich jedoch um primäre Zellen, die teilweise mit einer sehr geringen Frequenz im Blutsystem vorhanden sind (hämatopoietische Stammzellpopulationen und Subpopulationen der Natürlichen Killerzellen, NK-Zellen).

Im Rahmen der Etablierung des miRNA-Chips konnten zufriedenstellende Ergebnisse mit Proben der humanen CD4-positiven T-Zelllinie Jurkat erzielt werden. Allerdings waren die Resultate bei der Verwendung von isolierter RNA aus primären humanen NK-Zellen nicht zufriedenstellend. Neben sehr schwachen Hybridisierungssignalen war auch eine zu breite

Streuung derselben messbar, so dass nicht zwischen spezifischen und unspezifischen Signalen unterschieden werden konnte.

Diese Ergebnisse bedingten die Verwendung einer sensitiveren sowie spezifischeren Analysemethode. Dafür kam vor allem der 330-Multiplex-Assay von Applied Biosystems (Foster City, USA) infrage. Basierend auf der Verwendung von 330 verschiedenen miRNA-spezifischen Primern in einer einzigen Reversen Transkriptionsreaktion und der anschließenden Messung der Transkriptmenge mittels TaqMan-Real Time-PCR erlaubt dieser Assay die Analyse kleinster Zellmengen bis hin zur Untersuchung der miRNA-Expression auf Einzelzellebene (Lao et al., 2007; Tang et al., 2006). Unter Verwendung dieses Assays wurden kürzlich Daten publiziert, bei denen das miRNA-Expressionsprofil in einzelnen Zellen untersucht wurde (Tang et al., 2006; Tang et al., 2007). Während für die erste Analyse (Tang et al., 2006) murine embryonale Stammzellen verwendet wurden und das Einzelzellniveau durch serielle Verdünnung und nicht durch einzeln isolierte Zellen erlangt wurde, nutze die Arbeitsgruppe von Surani für die folgenden Untersuchungen murine Oozyten zur Analyse einzelner Zellen (Tang et al., 2006; Tang et al., 2007).

Zunächst wurde der kommerzielle nicht erhältliche Multiplex-Assay getestet und für die Untersuchung der miRNA-Expression hämatopoietischer Zellen optimiert. Erste Experimente unter Verwendung der USSC (*unrestricted somatic stem cell*, Kogler et al., 2004), freundlicherweise von Prof. Kögler zur Verfügung gestellt), zeigten, dass der 330-Multiplex-Assay für die Untersuchung humaner Stammzellen auf Einzelzellebene nicht geeignet ist (Daten nicht dargestellt). Die Messung der ubiquitär exprimierten miR-16-Transkripte zeigte einen bis zu 16-fachen Expressionsunterschied, der sowohl auf einer unterschiedlichen Effizienz des Assays (Lyse und Sensitivität) als auch auf Variationen der miRNA-Expression in einzelnen Zellen beruhen kann. Die Diskrepanz zu den Einzelzellanalysen der Surani-Gruppe lässt sich vor allem dadurch erklären, dass im Gegensatz zu primären hämatopoietischen Zellen Oozyten eine viel höhere Ausgangsmenge an Erbmaterial besitzen, was eine Analyse der Zellen auf Einzelzellniveau erleichtert.

Um die für die Untersuchung von primären hämatopoietischen Stammzellen sowie ausdifferenzierten Zellreihen des Blutsystems geeignete Zellanzahl zu ermitteln, wurde eine Verdünnungsreihe unter Verwendung von 1 bis 100000 Zellen der humanen T-Zelllinie Jurkat durchgeführt (Kap. 3.2.1., Abb. 3.4). Bei der Nutzung von Minimalzellzahlen (1 bis 100 Zellen) konnte nur ein Drittel der miRNAs nachgewiesen werden, die unter Verwendung von 5000 und mehr Zellen messbar waren. Effiziente und reproduzierbare Ergebnisse wurden ab

einer Zellzahl von 5000 primären Zellen erzielt. Mit zunehmender Zellzahl konnten zwar fünf zusätzliche miRNAs detektiert werden, jedoch stieg mit der höheren Zellausgangsmenge auch die Gefahr unspezifischer PCR-Amplifikationsprodukte. Aufgrund des limitierten Zellmaterials, welches für die Untersuchung der miRNA-Expression in der Hämatopoiese zur Verfügung stand, wurde eine Zellzahl von 5000 primären Zellen als optimal befunden. Dieser Ansatz stellt den Kompromiss zwischen der Sensitivität - Einsatz einer ausreichenden Menge an Zellmaterial - und der Spezifität des Assays - Verhinderung unspezifischer PCR-Signale - dar.

Die Spezifität der 330-Multiplex-Assays wurde durch einen Vergleich der generierten Daten mit einem vergleichbaren PCR-Assay, der auf Einzelreaktionen beruht (Einzel-PCR-Assay, Kap. 2.11.7.2), mittels Northern Blot Analysen sowie durch Literaturrecherchen untersucht (Abb. 3.9). Die Daten für HeLa- sowie Jurkat-Zellen zeigten eine weitgehende Korrelation mit den veröffentlichten Daten (Chen et al., 2004; Monticelli et al., 2005; Nelson et al., 2004; Ramkissoon et al., 2006). So konnte die in hämatopoietischen Zellen verstärkt exprimierte miR-181a in CD4-positiven Jurkat-Zellen jedoch nicht in HeLa-Zervixkarzinomzellen nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich in dieser vergleichenden Analyse auch eine Diskrepanz zwischen dem Multiplex-Assay und anderen Analysemethoden. Die für hämatopoietische Zellen als spezifisch und stark exprimiert beschriebene miR-142-3p (Chen et al., 2004; Landgraf et al., 2007; Ramkissoon et al., 2006) konnte mit dem Multiplex-Assay nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.9). Im Gegensatz dazu stellte miR-142 bei der Untersuchung der miRNA-Expression hämatopoietischer Zellen unter Verwendung einer *small RNA*-Klonierungsmethode bis zu 50% der Klone dar (Landgraf et al., 2007; Wu H, 2007). Diese Daten konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. So zeigte miR-142-3p in diversen Untersuchungen weder im Real-Time PCR-Assay (Einzel-PCR-Assay) noch in der Northern Blot-Analyse eine so starke Expression, die höher als die Expressionsstärke von miR-16 ist (Abb. 3.9).

Wu et al. (Wu H, 2007) untersuchten anhand ihrer Daten auch den Grad des Polymorphismus einzelner miRNAs und beobachteten, dass es sowohl im Bereich der 5'-Enden als auch der 3'-Enden Nukleotidaustausche gibt. Während jedoch die Mehrheit der miRNAs identische Sequenzen in bestimmten, den *seed* (Bindestelle der miRNA an die Zielmoleküle) kodierenden 5'-Enden besitzt, weist nur miR-142 eine hohe Frequenz an 5'-Variationen auf. Die Autoren vermuten, dass dieses Phänomen aus einer Verschiebung der miRNA-Prozessierung durch Drosha und/oder Dicer resultiert, in der Deletionen von 1 bis 3 Nukleotiden am 5'-Ende des einen Stranges assoziiert sind mit dem Überhang der

korrespondierenden Nukleotide am 3'-Ende des anderen Stranges. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass es sich bei der miR-142 um einen der seltenen Fälle handelt, in dem beide Stränge der hairpin-Struktur maturiert werden, nämlich miR-142-3p und miR-142-5p. Die von Wu und Koautoren dargestellte Beobachtung fällt bei näherer Betrachtung auch in älteren Arbeiten auf. So sind auf den Northern Blots in der Publikation von Chen et al. mehrere undeutliche Banden für miR-142 zu erkennen (Chen et al., 2004). Diese Beobachtungen können ein Grund dafür sein, weshalb die Expressionsdaten für miR-142 bei der Verwendung verschiedenen Analysemethoden kontrovers sind. Die Methode der TaqMan-basierenden Real-Time PCR detektiert nur die reife miRNA-Sequenz, für die der verwendete Primer komplementär ist (Sequenz aus der miRNA-Registry, Stand 2005; Griffiths-Jones, 2004), während die Klonierung kleiner RNA-Moleküle und deren Sequenzierung einen Überblick über alle vorhandenen miRNAs ermöglicht.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse beschreiben zum ersten Mal die miRNA-Expression in verschiedenen humanen hämatopoietischen Zelltypen unter Einbeziehung der seltenen hämatopoietischen Stammzellsubpopulationen HSC (*hematopoietic stem cell*) und HPC (*hematopoietic progenitor cell*). Dabei lag der Focus auf der Differenzierung definierter Zellschicksale aus primitiven Stammzellen, wobei neben multipotenten hämatopoietischen Stammzellen auch pluripotente humane embryonale Stammzellen in die Analyse mit einbezogen wurden.

Anhand von Clusteranalysen lassen sich drei Gruppen von miRNAs in der Hämatopoiese unterscheiden: a) miRNAs, die in keiner der analysierten Zellpopulationen nachweisbar waren (dies sind 1/4 der 330 untersuchten miRNAs), b) miRNAs, die in allen untersuchten Zellpopulationen gemessen werden konnten (ebenfalls 1/4 der 330 untersuchten miRNAs) und c) miRNAs, die in unterschiedlichen Differenzierungsstadien differentiell exprimiert werden können und ungefähr die Hälfte der miRNAs (n = 157) ausmachen.

Innerhalb der Gruppe der differentiell exprimierten miRNAs zeigte sich, dass die miRNA-Signatur sowohl zwischen ausdifferenzierten und primitiveren hämatopoietischen Zellreihen als auch zwischen verschiedenen Stammzelltypen Unterschiede aufweist, die auf der Expression einzelner miRNAs sowie deren Transkriptmenge beruhen (Abb. 3.14).

Mit einer Expression von zwei Dritteln der messbaren miRNAs besitzen humane embryonale Stammzellen (hESC) der Zelllinie I3 sowohl die absolut grösste Anzahl an exprimierten

miRNAs als auch die meisten differentiell exprimierten miRNAs. Korrelierend zu den Expressionsanalysen humaner embryonaler Stammzellen von Suh et al. konnte die Expression von genomisch-gruppierter miRNAs (=miRNA-Clustern) beobachtet werden, die während der Differenzierung runterreguliert/abgeschaltet wird (Suh et al., 2004). So konnten die Mitglieder des miR-302-Clusters auf Chromosom 4 (miR-302a*, miR-302a, miR-302b*, miR-302b, miR-302c*, miR-302c, miR-302d und miR-367) sowie zwei der miRNAs des miR-371-Clusters auf Chromosom 19 (miR-371 und miR-373*) auch in den hier dargestellten Untersuchungen exklusiv in hESCs gemessen werden (Abb. 3.18). Zusätzlich konnte die Expression von zwei weiteren miRNA-Clustern auf Chromosom 19 (miR-515 und miR-520-Cluster) nachgewiesen werden, für die in adulten Zelltypen keine Transkripte messbar waren (Abb. 3.18). Suh und Kollegen zeigen, dass die miRNAs aus dem miR-371-Cluster eine schnelle Runterregulation der Expression erfahren, die noch vor der Expression von OCT4, dem frühesten bekannten Marker embryonaler Stammzellen, stattfindet, und vermuten deshalb, dass diese miRNAs ein frühes Stadium der embryonalen Entwicklung definieren. Demzufolge kann auch für die miR-515- und miR-520-Cluster eine solche Funktion vermutet werden. Interessant ist die Beobachtung, dass die meisten miRNA-Cluster auf Chromosom 19 lokalisiert sind. Dieses Chromosom weist auch eine hohe Dichte an mRNA-kodierenden Genclustern auf.

Auffallend ist, dass die Anzahl der differentiell exprimierten miRNAs im Laufe der Differenzierung abnimmt und ihre Expression in ausdifferenzierten hämatopoietischen Zellpopulationen teilweise oder ganz verloren geht. So weisen miRNAs in hämatopoietischen Stammzellen eine schwächere Expression auf als in hESCs und sind in adulten Zellpopulationen gar nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.18).

So konnte für die Subpopulationen der adulten Blutstammzellen HSC und HPC eine gegenüber hES-Zellen reduzierte, jedoch zwischen den beiden Subpopulationen vergleichbare Anzahl an exprimierten miRNAs nachgewiesen werden (182 zu 179 miRNAs). Die Analyse individueller lymphoider Zellreihen ergab im Mittel eine Expression von 120 miRNAs, während die Menge an nachweisbaren miRNAs in den myeloiden Zelllinien zwischen 114 miRNAs (Granulozyten) und 155 miRNAs (Thrombozyten) lag. Korrelierend zu den Daten anderer Gruppen, konnten die in ausdifferenzierten hämatopoietischen Zellen angereichert exprimierten miRNAs nachgewiesen werden (mit Ausnahme von miR-142, siehe oben).

Es konnte die Beobachtung von Zhou et al. (Zhou et al., 2007) einer starken Expression von miR-150 in reifen B- und T-Zellen bestätigt werden. Die Expressionsstärke von miR-150 war

in allen untersuchten lymphoiden Zellpopulationen sehr stark, während sie sowohl in den hämatopoietischen Stammzellpopulationen als auch in den myeloiden Zelltypen mindestens 12-fach reduziert nachweisbar war.

Die hohe Expression von miR-223 in der myeloiden Zelllinie verbunden mit der grössten Transkriptmenge in Granulozyten konnte ebenfalls bestätigt werden (Fazi et al., 2005; Fukao T, 2007; Ramkissoo et al., 2006). Während Fazi jedoch eine myeloid-restringierte Expression dieser miRNA postulierte, konnte in dieser Arbeit aufgrund der sensitiveren Analysemethoden eine etwa 20-fach geringere Expression in CD8-positiven T-Zellen sowie B-Zellen und eine drastisch reduzierte Expression in CD4-positiven T-Zellen sowie NK-Zellen (mehr als hundertfach) gemessen werden. Interessanterweise konnte von allen untersuchten myeloischen Zelltypen gerade in den Granulozyten die geringste Gesamtanzahl miRNAs gemessen werden. Dies könnte mit der von Fazi und Kollegen gezeigten Kontrolle der Granulopoese durch miR-223 und die beiden Transkriptionsfaktoren NFI-A und C/EBP α sowie der kurzen Lebensdauer der Granulozyten in Verbindung gebracht werden.

Im Rahmen einer statistischen Auswertung konnten 29 miRNAs ermittelt werden, von denen sieben der lymphoiden Zellreihe der Hämatopoese zugeordnet werden können und die verbleibenden 22 Myelopoese-spezifische miRNAs sind (Abb. 3.26). Die hohe Anzahl an in myeloiden Zellen angereicherten miRNA kann aus der kurzen Lebensdauer sowie der Biogenese myeloider Zellen resultieren. Lymphoide Zellen zirkulieren wesentlich länger in der Peripherie und haben dadurch die Möglichkeit, nicht mehr benötigte Differenzierungsspezifische miRNAs abzubauen.

Diese Arbeit beinhaltet auch die erste beschriebene Analyse des miRNA-Profiles in Thrombozyten. Obwohl die Blutplättchen aufgrund ihrer Abschnürung von Megakaryozyten im Knochenmark keinen Zellkern enthalten, konnten in ihnen Gentranskripte nachgewiesen werden, welche aus den Megakaryozyten stammen (Newman PJ, 1988; Weyrich AS, 2004). Durch die Erstellung von mRNA-Expressionsprofilen unter Verwendung der DNA-Chiptechnologie konnte eine für Blutplättchen spezifische mRNA-Signatur ermittelt werden, obwohl die Gesamtanzahl der exprimierten Genen im Vergleich zu anderen humanen Zelltypen geringer ist (Healy et al., 2006; Raghavachari et al., 2007). Die hohe Anzahl an gemessenen miRNAs in Thrombozyten in dieser Arbeit (155 miRNAs) kann demnach aus deren Biogenese resultieren, d.h. der Abschnürung aus den Megakaryozyten. Bedingt durch die kurze Lebensdauer der Thrombozyten (5-10 Tage) sowie dem langsamen Abbau reifer miRNA-Moleküle stammt somit ein Grossteil der miRNAs aus megakaryozytären Vorläufern

(Abb. 3.23 und 3.24). Ob diese in der Translationsmaschinerie der Thrombozyten involviert sind (Kieffer N, 1987) und dadurch eine direkte biologische Funktion in den kurzlebigen Blutplättchen haben, bleibt im Rahmen weiterer Experimenten zu beantworten.

CD4-positiven T-Zellen scheinen das kleinste miRNA-Repertoire aller untersuchten reifen Leukozyten aufzuweisen. Bemerkenswerterweise wurde unter Verwendung von Dicer-Knockout-Mäusen beobachtet, dass in diesen Mäusen die Reifung der peripheren CD8⁺ T-Zellen blockiert ist, während die Dicer-defizienten CD4⁺ T-Zellen ausreifen und später apoptotisch werden (Muljo et al., 2005). Dies spricht dafür, dass die miRNAs in der Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen eine grössere Bedeutung haben als in CD4⁺ T-Helfer-Zellen.

Bemerkenswerterweise konnten nur wenige spezifische miRNA für ausdifferenzierte leukozytäre Zellpopulationen nachgewiesen werden. Alle in einem Zelltyp vergleichend zu den anderen lymphoiden oder myeloiden Zellreihen exklusiv gemessenen miRNAs weisen bereits in den hämatopoietischen Stammzellen eine Expression auf. Nur in den Untersuchungen der NK-Zell-Subpopulationen CD56^{Bright} und CD56^{Dim} konnten NK-spezifische miRNAs nachgewiesen werden, die in keinem anderen hämatopoietischen Zelltypen exprimiert sind (Abb. 3.28). Aufgrund der vergleichbaren Expression der miRNAs in reifen Blutzellen erscheint es unwahrscheinlich, dass miRNAs Zelltyp-spezifische Expressionsmuster aufrecht erhalten.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten zeigen zwar nicht zum ersten Mal, dass miRNAs linienspezifisch exprimiert werden, ermöglichen jedoch aufgrund der angewandten Methode eine Aussage über die Komplexität des miRNA-Repertoires in verschiedenen Zellstadien. Diese Fragestellung ist weder durch globale Analysen unter Verwendung von Microarrays noch durch Klonierungsmethoden zu beantworten. Während bei der ersten Technik die Möglichkeit der Hybridisierung von pre-miRNAs besteht, so dass dadurch keine exklusive Aussage der biologisch relevanten miRNA-Moleküle möglich ist, müssten bei Untersuchungen mittels Klonierung der miRNAs eine viel grössere Anzahl an Klonen untersucht werden. Die aus Effizienzgründen gewählte Zahl von etwa 1000 miRNA-Klonen bei der Analyse der Daten von Landgraf et al. (Landgraf et al., 2007) repräsentiert eine viel zu

geringe Anzahl, als dass dadurch das miRNA-Repertoire in seiner Komplexität von potentiell etwa 500 miRNAs wiedergegeben werden kann.

Wie die folgende Abbildung verdeutlicht, erfolgt im Rahmen der hämatopoietischen Differenzierung primitiver multipotenter Zellen in definierte Zellschicksale eine signifikante Abnahme der Komplexität des miRNA-Repertoires.

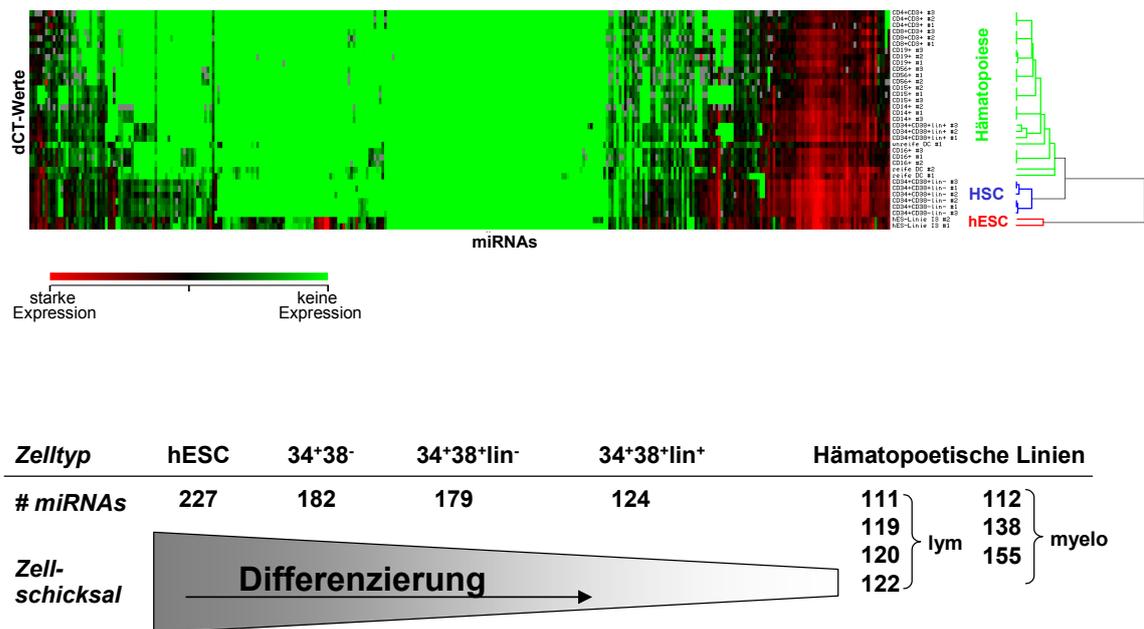


Abb. 4.1: Komplexität der miRNAs im Rahmen der hämatopoietischen Differenzierung.

Clusteranalyse der untersuchten hämatopoietischen Zellpopulationen sowie der humanen embryonalen Stammzellen unter Verwendung der gemessenen Expressionsstärken der 330 miRNAs. Das vom Differenzierungsstadium abhängige miRNA-Repertoire ist anhand der messbaren miRNA-Anzahl (#miRNA) dargestellt.

So sind viele der in embryonalen Stammzellen exprimierten miRNAs bereits auf der Ebene der multipotenten hämatopoietischen Stammzelle nicht mehr nachweisbar. Diese Tendenz setzt sich auch in den weiteren Stadien der Differenzierung zu definierten Zellschicksalen fort. Von etwa 180 miRNAs in den beiden Stammzellpopulationen HSC und HPC sind in den determinierten HPCs (CD34⁺38⁺lin⁺) bereits nur noch 124 miRNAs exprimiert (Abb. 4.1). Die miRNA-Synthese wird im Rahmen der Differenzierung nicht nur für einige Gene komplett abgeschaltet, vielmehr sind die Mehrzahl der exprimierten miRNAs auch mit einer

geringeren Transkriptmenge nachweisbar. Umgekehrt konnten nur sehr wenige miRNAs nachgewiesen werden, deren Expression verstärkt oder ausschliesslich in ausdifferenzierten Blutzellen gemessen werden konnte.

Interessanterweise konnte eine Abnahme der miRNA-Komplexität auch im Vergleich von Nabelschnurblut zu peripherem Blut gezeigt werden (Abb. 3.29). So war das miRNA-Repertoire in NK-Zellen aus Nabelschnurblut (CB) viel grösser als die gleiche Zellpopulation aus peripherem Blut (PB, 153 zu 122 miRNAs). Eine ähnliche Beobachtung konnte auch von Georgantas et al. anhand des mRNA-Profiles von HSCs aus dem CB und HSCs aus Knochenmark oder peripherem Blut gemacht werden (Georgantas et al., 2007). Die Abnahme der miRNA-Komplexität zwischen CB und PB könnte damit zusammenhängen, dass es sich bei Zellen aus fötalem CB um primitivere Zellen handelt als aus adulten Spendern.

Weiterhin konnte auch bei Landgraf et al. eine Abnahme der miRNAs im Rahmen der Differenzierung von CD34⁺-Zellen in ausdifferenzierte Blutzellen beobachtet werden, allerdings war sie nicht so offensichtlich und basierte auf einer geringeren Amplifikation von miR-142 (Landgraf et al., 2007).

Ebenso kann man genauerer Betrachtung der radioaktiv-gemessenen miRNA-Expressionsprofile muriner Hämatopoiesestadien bei Monticelli et al. eine Änderung der Signalmenge erkennen (Monticelli et al., 2005). So weisen Pro-B-Zellen eine komplexere miRNA-Signatur als B-Zellen aus der Milz auf. Ebenso erfolgte durch die Induktion von naiven T-Zellen in Richtung einer TH1- oder TH2-Differenzierung ein schnelles Runterregulieren verschiedener miRNAs.

Die Arbeitsgruppe um Strauss (Chen C, 2007; Strauss et al., 2006), die unter Verwendung des Multiplex-Assays miRNA-Profile von murinen ES-Zellen, embryoid bodies und verschiedenen Körpergewebetypen analysiert haben, kam hingegen zu einem anderen Schluss. Diese Arbeitsgruppe beobachtete in ES-Zellen eine geringere miRNA-Expression als in somatischen Zellen und begründeten dies damit, dass die einfache miRNA-Signatur den unreifen Zustand dieses primitiven Zelltyps widerspiegelt. Demgegenüber sollte das komplexe miRNA-Repertoire in somatischen Zellen deren reifen Entwicklungsstatus reflektieren (Strauss et al., 2006). Allerdings muss hierbei bemerkt werden, dass es sich bei den von Strauss verwendeten RNA-Fraktionen für die somatischen Gewebe nicht um einzelne, hochaufgereinigte Zelltypen handelt, sondern um RNA, die aus Organen wie Herz, Leber oder Niere isoliert wurde und die dadurch eine Mischung verschiedenster Zellpopulationen darstellt. Somit wurden bei diesen Analysen die miRNAs aller in diesem

Gemisch vorhandenen Zellen amplifiziert und analysiert. Eine klare Aussage über die miRNA-Komplexität von Gewebetypen im Vergleich zu aufgereinigten, spezifischen Zelltypen wie murinen embryonalen Stammzellen kann so nicht erbracht werden.

Zusammenfassend kann bemerkt werden, dass anhand der in dieser Arbeit generierten Daten erstmalig eine progradiente Reduktion der miRNA-Expression im Rahmen der Differenzierung beschrieben werden konnte.

Bei der Hämatopoiese handelt sich um einen vielschichtigen Prozess, bei dem unreife Blutvorläuferzellen eine breite, promiskuitive Transkription aufweisen, während in Zellen mit einem restringierten Zellschicksal Transkripte, die anderen Blutzelltypen zugeordnet werden können, verschwinden und die linienspezifische Genexpression verstärkt ist (Hu et al., 1997). Diese Promiskuitivität in pluri-/multipotenten Stammzellen konnte durch mRNA-Genexpressionsanalysen gezeigt werden. So ergaben Vergleiche zwischen humanen embryonalen Zellen der Linie H9.2 und adulten, ausdifferenzierten Zellen des hämatopoietischen sowie keratinozytären Systems ein für die Stammzellen komplexeres Genprofil mit einer gleichzeitig signifikant erhöhten Anzahl an stark exprimierten mRNA-kodierenden Genen (Golan-Mashiach et al., 2004). Eine vergleichbare Tendenz zeigten Untersuchungen muriner und humaner Stammzellpopulationen (Akashi et al., 2003; Georgantas et al., 2004; Terskikh et al., 2003). In der primitiveren, Stammzell-angereicherten Fraktion HSC konnte eine grosse Anzahl an exklusiv in dieser Stammzellpopulationen exprimierten Genen erfasst werden, deren Expression im Verlauf der Differenzierung zur HPC abgeschwächt oder ausgeschaltet wird, während Zelllinien-spezifische Gene aktiviert werden und in einem Zelltyp-spezifisches/restringiertes Transkriptom resultiert.

Die erhöhte und breitgefächerte Genexpression, welche durch die Pluri-/Multipotenz dieses Zelltyps bedingt ist, erlaubt den Stammzellpopulationen viele Differenzierungsmöglichkeiten, sowie ein rasches Umsetzen eines definierten Zellschicksals durch die grosse Anzahl an aktiven Genen. Dabei werden im weiteren Verlauf der Differenzierung selektiv die Gene fortwährend exprimiert, die für die Entwicklung eines Zelltyps benötigt werden, während die Expression der restlichen, nicht benötigten Gene nach dem Festlegen des Zellschicksals herunter reguliert wird (Golan-Mashiach et al., 2004). Dieses Selektionsmodell der Genexpression während der Differenzierung wird wahrscheinlich durch die offene Chromatinstruktur im Stammzellstadium sowie epigenetischer Modifikationen in der Maturierung ermöglicht (Grewal and Moazed, 2003; Razin, 1998). Dieser offene

epigenetische Zustand erlaubt der Stammzelle durch eine verstärkte Expression eines bestimmten Genmusters auf Transkriptionsebene die Differenzierung in jede Zellreihe, ohne dabei eine aufwendige Änderung des Chromatins vornehmen zu müssen. Dieser These folgend, konnten in Analysen des Transkriptom primitiver Stammzellen eine Reihe von schwach exprimierten Genen detektiert werden, die normalerweise mit nicht-hämatopoietischen Zelltypen assoziiert sind. So konnten die Expression von neural-assoziierten (Steidl et al., 2004) sowie endothelial-, Leber- und Muskel-assoziierten Genen in hämatopoietischen Stammzellpopulationen nachgewiesen werden (Georgantas et al., 2004).

Welche Rolle spielen miRNAs?

Wie oben angeführt, konnte in embryonalen sowie hämatopoietischen Stammzellen eine promiskuitive Genexpression nachgewiesen werden, die im Rahmen der Differenzierung durch ein schnell induzierbares, restriktives Transkriptom ersetzt wird (Akashi et al., 2003; Georgantas et al., 2004; Golan-Mashiach et al., 2004; Terskikh et al., 2003). Die Tatsache, dass die Komplexität des Transkriptoms im Zuge der Zelldifferenzierung abnimmt, scheint in einem scheinbaren Widerspruch zu der gleichzeitig abnehmenden Komplexität des miRNA-Repertoires zu stehen. Um diesen Widerspruch aufzulösen, muss man einen Paradigmenwechsel bezüglich der Funktion von miRNAs fordern: Betrachtet man die promiskuitive Genexpression in Stammzellen als notwendige Voraussetzung, um eine flexible Antwort auf exogene Differenzierungsstimuli zu ermöglichen, so muss die Stammzelle über ein Instrument verfügen, um die so auftretenden, unspezifischen Transkripte zu neutralisieren. Hier bieten sich miRNAs als ideale Werkzeuge an, um die Translation dieses „Background“-Transkriptoms zu verhindern, ohne dabei eine permanente Abschaltung der Genexpression zu verursachen.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten sprechen dafür, dass diese Funktion von den miRNAs übernommen wird. Demnach sind die miRNAs Modulatoren der Genexpression und führen zur Eliminierung „unerwünschter“ Genprodukte, indem sie deren Proteinsynthese unterbinden. Die starke und korrelierend zu den Stammzellen promiskuitive Expression der miRNAs in primitiven Zellen ermöglicht somit ein rasches Einstellen/Fine-Tuning des Expressionsprogramms. Diese Theorie wird durch die oben angeführten Publikationen gestützt, in denen Transkripte Linien-fremder Marker gemessen werden konnten, deren

Proteinexpression in hämatopoietischen Zellen jedoch nicht nachweisbar war (Georgantas et al., 2004; Steidl et al., 2004)).

Das in Abb. 4.2 dargestellte Schema verdeutlicht die angeführte Theorie.

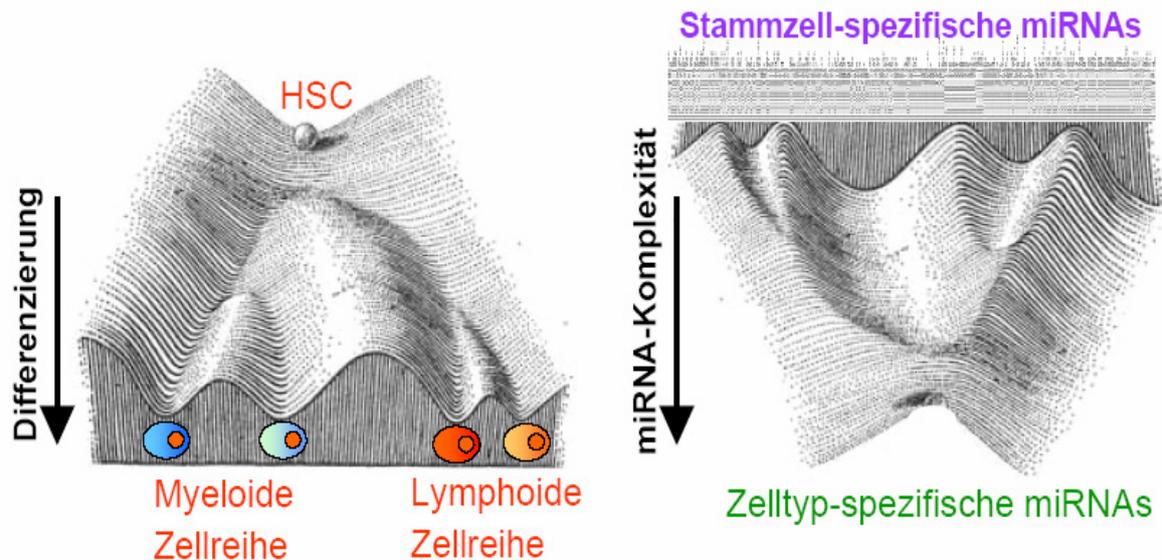


Abb. 4.2: Schema der Rolle der miRNAs im Rahmen der Zellschicksals-restringierten Ausreifung hämatopoietischer Zelltypen.

Hämatopoietische Stammzellen (HSC) haben neben einer permanenten Selbsterneuerung auch das Potential, in jede blutbildende Zellpopulation auszudifferenzieren. Im Rahmen der Zelldifferenzierung wird die Multipotenz der HSC immer weiter eingeschränkt bis ein unipotentes Zellschicksal erreicht ist (linker Abbildungsteil). HSCs weisen ein sehr komplexes miRNA-Repertoire auf, das im Laufe der Differenzierung auf das jeweilige Zellschicksal restringiert wird (rechter Abbildungsteil; modifiziert nach Waddington, 1957).

Die Stammzelle als multipotenter Zelltyp kann entweder eine Selbsterneuerung erfahren oder als Antwort auf exogene Signale in einen bestimmten Zelltyp ausreifen. Dies wird durch einen offenen Chromatinstatus der Stammzellen ermöglicht. Kürzlich konnte von Günther et al. (Guenther et al., 2007) gezeigt werden, dass in hESCs etwa 75% der potentiell Proteinkodierenden Gene eine für aktive Gene stehende Modifikation aufweisen (Methylierung in Histone H3 an Lysin 4 -*H3K4me3*- sowie Acetylierung des Histons 3 an Lysin 9 -*H3K9,14Ac*- in Promotor-nahen Bereichen). Diese Markierungen waren stark angereichert in den Promotoren von Genen, die die stärkste Genexpression aufwiesen. Jedoch konnten nur für etwa die Hälfte der aktiven Gene messbare Transkripte nachgewiesen werden, was u. U. daran liegen kann, dass besonders schwach transkribierte Genprodukte in Microarray-

Analysen nicht messbar waren. Interessanterweise ergaben quantitative Proteomanalysen eine geringe Korrelation zwischen der gemessenen mRNA-Expression und dem Proteinspiegel. So zeigte die Untersuchungen muriner hämatopoietischer Stammzellen eine etwa 50% Übereinstimmung (Unwin and Whetton, 2006), während in einer Differenzierungsstudie embryonaler Stammzellen in Richtung der mesodermalen Zellreihe 90% der Proteinexpression nicht mit der Menge an mRNA-Transkripten übereinstimmten (Williamson et al., 2007). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Translation der Genprodukte durch miRNAs inhibiert wird, da der offene Chromatinstatus der Stammzelle nicht nur die Transkription der mRNA-kodierenden Gene bedingt, sondern daraus auch das Ablesen von miRNA-Transkriptionseinheiten resultiert. Demzufolge können so nicht benötigte und auf geringem Niveau exprimierte mRNA-Transkripte durch miRNAs inhibiert werden (Farh KK, 2005; Guenther et al., 2007), wobei die miRNAs auf eine indirekte Art die Komplexität einer Zelle steuern. Im weiteren Verlauf der Differenzierung und somit Spezialisierung der Zelle erfolgt das permanente Abschalten der Genexpression vor allem durch epigenetische Modifikation. Die offenen, euchromatischen Bereiche werden geschlossen und resultieren in einer heterochromatischen Struktur. Es wäre möglich, dass dabei bereits viele Transkriptionseinheiten der miRNAs inaktiviert werden. Da das Transkriptom ausdifferenzierter Zellen durch epigenetische Modulation und die Expression Zelltyp-spezifischer Repressoren sehr stark restringiert und determiniert wird, ist eine aktive Regulation der Proteinmenge durch miRNAs nicht mehr im gleichen Maße nötig wie dies in unrestringierten Stammzellen der Fall ist.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass miRNAs aufgrund ihrer Interaktionsmöglichkeit mit diversen Zielgenen schnell und reversibel die Umsetzung der Genexpression in hochdynamischen Zellstadien steuern, während die Zelltyp-spezifische Expression zur Aufrechterhaltung der Zellidentität durch andere Mechanismen wie Epigenetik und Transkriptionsfaktoren kontrolliert wird. Diese beschriebene Rolle der miRNAs scheint sicherlich auch für einen so komplexen Prozess wie die Hämatopoese wichtig zu sein. Jedoch konnte auch unter Verwendung eines *in vitro* Differenzierungsmodells embryonaler Stammzellen in neurale Vorläuferzellen zusätzlich gezeigt werden, dass die miRNA-Komplexität nicht nur im Rahmen der Blutbildung abnimmt, sondern auch in der neuronalen Entwicklung. Demzufolge kann die hier angeführte Hypothese der miRNA-Funktion Keimblatt-übergreifend aufgestellt werden.

5 Zusammenfassung

MicroRNAs (miRNAs) sind kurze, nicht Protein-kodierende RNA-Moleküle, die eine wichtige und globale regulatorische Rolle für die Inhibition der Translation sowie Degradation von mRNA spielen. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der miRNAs im hämatopoietischen System zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde ein sensitives auf TaqMan PCR-basierendes Nachweissystem etabliert, mit dem auch seltene Zellpopulationen analysiert werden können. Es konnte erstmals eine systematische Analyse der miRNA-Expressionsmuster aller hämatopoietischen Linien unter Verwendung aufgereinigter hämatopoietischer Stammzellpopulationen sowie definierter primärer Leukozyten-Populationen durchgeführt werden. So konnte für hämatopoietische Stammzellen ein spezifisches miRNA-Profil erstellt werden, welches sich signifikant von dem ausdifferenzierter Zellreihen der lymphoiden bzw. myeloiden Zellpopulationen unterschied. Die verschiedenen hämatopoietischen Zelltypen ordneten sich in einer Ähnlichkeitsabfrage in separate Gruppen entsprechend ihrer myeloiden oder lymphoiden Herkunft an, zeigten jedoch global alle einen hohen Grad an Übereinstimmung in ihrer miRNA-Expression. Es konnten sieben miRNAs identifiziert werden, die für den lymphoiden Zweig der Hämatopoese spezifisch sind, während 22 miRNA exklusiv in myeloiden Blutzellen exprimiert waren.

Der globale Vergleich der miRNA Profile von pluripotenten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen), multipotenten hämatopoietischen Stammzellpopulationen unterschiedlichen Differenzierungsgrads, sowie unipotenten ausdifferenzierten Blutzellen zeigte eine progradiente Abnahme sowohl der Komplexität des miRNA-Repertoires als auch der relativen Expressionsstärke der einzelnen miRNAs. So exprimierten ES-Zellen ein komplexes Repertoire von annähernd 230 miRNAs, das in angereicherten hämatopoietischen Stammzellen bereits auf ungefähr 180 miRNAs eingeschränkt war und schließlich in den myeloiden (114-155 miRNAs) bzw. lymphoiden (111-121 miRNAs) Linien stark reduziert war. Eine verstärkte miRNA-Expression konnte auch im Vergleich von neonatalen (Nabelschnurblut) zu adulten (peripheres Blut) lymphozytären Populationen beobachtet werden. Aus diesen Daten kann die Hypothese abgeleitet werden, dass miRNAs nicht nur der Aufrechterhaltung der Identität ausdifferenzierter Zellpopulationen dienen, sondern vor allem eine wichtige Funktion im Rahmen der Differenzierung von Stammzellen haben.

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are short, non-protein-coding RNA molecules, which play an important and global role in the inhibition of translation as well as degradation of mRNA .

Aim of this thesis was the analysis of the role of miRNAs in the hematopoietic system. For this purpose a sensitive TaqMan PCR-based experimental system was established, that enables the analysis of low frequency cell populations. This study presents the first systematically analysis of miRNA signatures in all hematopoietic cell types using purified subpopulations of hematopoietic stem cells as well as defined primary leukocyte populations.

It was possible to generate a specific miRNA profile for hematopoietic stem cells, which are different from the miRNA profiles of differentiated cell lines of the lymphoid and myeloid cell populations. According to their myeloid or lymphoid origin, the different cell types separately clustered in an unsupervised hierarchical cluster analysis. However, on the global level all analysed mature cell populations showed a high degree of similarity. Only seven miRNAs were identified which are specific for lymphoid cell lines, whereas 22 miRNAs are exclusively expressed in myeloid blood cells.

The global comparison of miRNA profiles in pluripotent embryonic stem cells (ES cells), multipotent hematopoietic stem cells with a different status of differentiation as well as unipotent differentiated blood cells revealed a progradient decrease of both the complexity of the miRNA repertoire and the relative expression level of the individual miRNAs. ES cell expressed a complex repertoire of almost 230 miRNAs, that is restricted to 180 miRNAs in enriched hematopoietic stem cells and finally significantly reduced in myeloid (114-155 miRNAs) and lymphoid (111-121 miRNAs) cell lines. In correlation, an increased miRNA expression could be observed in a comparison of neonatal (cord blood) with adult (peripheral blood) lymphocyte populations.

These data suggest that miRNAs not only play a role in the maintenance of the identity of differentiated cell populations but also have an important function within the differentiation of stem cells.

6 Literaturverzeichnis

- Akashi, K., He, X., Chen, J., Iwasaki, H., Niu, C., Steenhard, B., Zhang, J., Haug, J., and Li, L. (2003). Transcriptional accessibility for genes of multiple tissues and hematopoietic lineages is hierarchically controlled during early hematopoiesis. *Blood* *101*, 383-389. 10.1182/blood-2002-06-1780.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* *404*, 193-197.
- Ambros, V., and Lee, R. C. (2004). Identification of microRNAs and other tiny noncoding RNAs by cDNA cloning. *Methods Mol Biol* *265*, 131-158.
- Aravin, A. A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J., and Tuschl, T. (2003). The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell* *5*, 337-350.
- Aukerman, M. J., and Sakai, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell* *15*, 2730-2741.
- Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., and Pasquinelli, A. E. (2005). Regulation by *let-7* and *lin-4* miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* *122*, 553-563.
- Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* *226*, 1209-1211.
- Barad, O., Meiri, E., Avniel, A., Aharonov, R., Barzilai, A., Bentwich, I., Einav, U., Gilad, S., Hurban, P., Karov, Y., *et al.* (2004). MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res* *14*, 2486-2494.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* *116*, 281-297.
- Bartel, D. P., and Chen, C. Z. (2004). Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet* *5*, 396-400.
- Baskerville, S., and Bartel, D. P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *Rna* *11*, 241-247.
- Basyuk, E., Suavet, F., Doglio, A., Bordonne, R., and Bertrand, E. (2003). Human *let-7* stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res* *31*, 6593-6597.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* *285*, 727-729.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* *431*, 356-363.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., and Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* *409*, 363-366.
- Bhatia, M., Bonnet, D., Kapp, U., Wang, J. C., Murdoch, B., and Dick, J. E. (1997). Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture. *J Exp Med* *186*, 619-624.

- Blum, H., Hildburg, B., and J., G. H. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna* 10, 185-191.
- Bonifer, C., Faust, N., Geiger, H., and Muller, A. M. (1998). Developmental changes in the differentiation capacity of haematopoietic stem cells. *Immunol Today* 19, 236-241.
- Bredenkamp, N., Seoighe, C., and Illing, N. (2007). Comparative evolutionary analysis of the FoxG1 transcription factor from diverse vertebrates identifies conserved recognition sites for microRNA regulation. *Dev Genes Evol* 217, 227-233.
- Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B., and Cohen, S. M. (2003). bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell* 113, 25-36.
- Brostjan, C., Sobanov, Y., Glienke, J., Hayer, S., Lehrach, H., Francis, F., and Hofer, E. (2000). The NKG2 natural killer cell receptor family: comparative analysis of promoter sequences. *Genes Immun* 1, 504-508.
- Brummendorf, T. H., Dragowska, W., Zijlmans, J. M. J. M., Thornbury, G., and Lansdorp, P. M. (1998). Asymmetric Cell Divisions Sustain Long-Term Hematopoiesis from Single-sorted Human Fetal Liver Cells 10.1084/jem.188.6.1117. *J Exp Med* 188, 1117-1124.
- Cai, X., Hagedorn, C. H., and Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna* 10, 1957-1966.
- Calin, G. A., Liu, C. G., Sevignani, C., Ferracin, M., Felli, N., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Cimmino, A., Zupo, S., Dono, M., *et al.* (2004a). MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11755-11760.
- Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., and Croce, C. M. (2004b). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2999-3004.
- Carmell, M. A., Xuan, Z., Zhang, M. Q., and Hannon, G. J. (2002). The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* 16, 2733-2742.
- Castriconi, R., Cantoni, C., Della Chiesa, M., Vitale, M., Marcenaro, E., Conte, R., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (2003). Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4120-4125.
- Chen C, R. D., Lee CT, Blake J, Sun Y, Strauss WM. (2007). Defining embryonic stem cell identity using differentiation-related microRNAs and their potential targets. *Mamm Genome* 18, 316-327.
- Chen, C., Ridzon, D., Lee, C. T., Blake, J., Sun, Y., and Strauss, W. M. (2007). Defining embryonic stem cell identity using differentiation-related microRNAs and their potential targets. *Mamm Genome* 18, 316-327.
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R., Andersen, M. R., *et al.* (2005a). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33, e179.

- Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F., and Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303, 83-86.
- Chen, J. F., Mandel, E. M., Thomson, J. M., Wu, Q., Callis, T. E., Hammond, S. M., Conlon, F. L., and Wang, D. Z. (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 38, 228-233.
- Chen, P. Y., Manninga, H., Slanchev, K., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., Sheridan, R., John, B., Marks, D. S., Gaidatzis, D., *et al.* (2005b). The developmental miRNA profiles of zebrafish as determined by small RNA cloning. *Genes Dev* 19, 1288-1293.
- Chen, P. Y., and Meister, G. (2005). microRNA-guided posttranscriptional gene regulation. *Biol Chem* 386, 1205-1218.
- Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740-744.
- Civin, C. I., Almeida-Porada, G., Lee, M. J., Olweus, J., Terstappen, L. W., and Zanjani, E. D. (1996a). Sustained, retransplantable, multilineage engraftment of highly purified adult human bone marrow stem cells in vivo. *Blood* 88, 4102-4109.
- Civin, C. I., Trischmann, T., Kadan, N. S., Davis, J., Noga, S., Cohen, K., Duffy, B., Groenewegen, I., Wiley, J., Law, P., *et al.* (1996b). Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis. *J Clin Oncol* 14, 2224-2233.
- Cullen, B. R. (2004a). Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs. *Virus Res* 102, 3-9.
- Cullen, B. R. (2004b). Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell* 16, 861-865.
- Cumano, A., Dieterlen-Lievre, F., and Godin, I. (1996). Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 86, 907-916.
- Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, R. H., Ketting, R. F., and Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231-235.
- Dostie, J., Mourelatos, Z., Yang, M., Sharma, A., and Dreyfuss, G. (2003). Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *Rna* 9, 180-186.
- Du, T., and Zamore, P. D. (2005). microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 132, 4645-4652.
- Dzierzak, E. (2002). Hematopoietic stem cells and their precursors: developmental diversity and lineage relationships. *Immunol Rev* 187, 126-138.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14863-14868.
- Emery, J. F., Floyd, S. K., Alvarez, J., Eshed, Y., Hawker, N. P., Izhaki, A., Baum, S. F., and Bowman, J. L. (2003). Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr Biol* 13, 1768-1774.

- Esau, C., Kang, X., Peralta, E., Hanson, E., Marcusson, E. G., Ravichandran, L. V., Sun, Y., Koo, S., Perera, R. J., Jain, R., *et al.* (2004). MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* *279*, 52361-52365.
- Farh KK, G. A., Jan C, Lewis BP, Johnston WK, Lim LP, Burge CB, Bartel DP. (2005). The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* *310*, 1817-1821.
- Fazi, F., Rosa, A., Fatica, A., Gelmetti, V., De Marchis, M. L., Nervi, C., and Bozzoni, I. (2005). A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* *123*, 819-831.
- Fehniger, T. A., Cooper, M. A., Nuovo, G. J., Cella, M., Facchetti, F., Colonna, M., and Caligiuri, M. A. (2003). CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity [10.1182/blood-2002-09-2876](https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2876). *Blood* *101*, 3052-3057.
- Felli, N., Fontana, L., Pelosi, E., Botta, R., Bonci, D., Facchiano, F., Liuzzi, F., Lulli, V., Morsilli, O., Santoro, S., *et al.* (2005). MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 18081-18086.
- Ferlazzo G, T. D., Lin SL, Goodman K, Morandi B, Muller WA, Moretta A, Münz C. (2004). The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* *172*, 1455-1462.
- Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F. A., and Pillai, R. S. (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol* *15*, 331-341.
- Friese, M. A., Wischhusen, J., Wick, W., Weiler, M., Eisele, G., Steinle, A., and Weller, M. (2004). RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated antglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo. *Cancer Res* *64*, 7596-7603.
- Fukao T, F. Y., Kiga K, Sharif J, Hino K, Enomoto Y, Kawamura A, Nakamura K, Takeuchi T, Tanabe M. (2007). An evolutionarily conserved mechanism for microRNA-223 expression revealed by microRNA gene profiling. *Cell* *129*, 617-631.
- Garzon, R., Pichiorri, F., Palumbo, T., Iuliano, R., Cimmino, A., Aqeilan, R., Volinia, S., Bhatt, D., Alder, H., Marcucci, G., *et al.* (2006). MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 5078-5083.
- Gekas, C., Dieterlen-Lievre, F., Orkin, S. H., and Mikkola, H. K. (2005). The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell* *8*, 365-375.
- Georgantas, R. W., 3rd, Hildreth, R., Morisot, S., Alder, J., Liu, C. G., Heimfeld, S., Calin, G. A., Croce, C. M., and Civin, C. I. (2007). CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 2750-2755.
- Georgantas, R. W., III, Tanadve, V., Malehorn, M., Heimfeld, S., Chen, C., Carr, L., Martinez-Murillo, F., Riggins, G., Kowalski, J., and Civin, C. I. (2004). Microarray and Serial Analysis of Gene Expression Analyses Identify Known and Novel Transcripts Overexpressed in Hematopoietic Stem Cells [10.1158/0008-5472.CAN-03-3247](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3247). *Cancer Res* *64*, 4434-4441.

- Gillis S, W. J. (1980). Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J Exp Med* *152*, 1709-1719.
- Golan-Mashiach, M., Dazard, J.-E., Gerecht-Nir, S., Amariglio, N., Fisher, T., Jacob-Hirsch, J., Biorai, B., Osenberg, S., Barad, O., Getz, G., *et al.* (2004). Design principle of gene expression used by human stem cells: implication for pluripotency. *FASEB J*, 04-2417fje. 10.1096/fj.04-2417fje.
- Gregory, R. I. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* *432*, 235-240.
- Grewal, S. I., and Moazed, D. (2003). Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* *301*, 798-802.
- Griffiths-Jones, S. (2004). The microRNA Registry. *Nucl Acids Res* *32*, D109-111. 10.1093/nar/gkh023.
- Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D. L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C. C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* *106*, 23-34.
- Guenther, M. G., Levine, S. S., Boyer, L. A., Jaenisch, R., and Young, R. A. (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* *130*, 77-88.
- Han, J. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* *18*, 3016-3027.
- Hanna J, B. P., Zhai Y, Youssef F, McLachlan K, Mandelboim O. (2004). Novel insights on human NK cells' immunological modalities revealed by gene expression profiling. *J Immunol* *173*, 6547-6563.
- Hanna, J., Wald, O., Goldman-Wohl, D., Prus, D., Markel, G., Gazit, R., Katz, G., Haimov-Kochman, R., Fujii, N., Yagel, S., *et al.* (2003). CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells. *Blood* *102*, 1569-1577. 10.1182/blood-2003-02-0517.
- Healy, A. M., Pickard, M. D., Pradhan, A. D., Wang, Y., Chen, Z., Croce, K., Sakuma, M., Shi, C., Zago, A. C., Garasic, J., *et al.* (2006). Platelet Expression Profiling and Clinical Validation of Myeloid-Related Protein-14 as a Novel Determinant of Cardiovascular Events. *Circulation* *113*, 2278-2284. 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.607333.
- Houbaviv, H. B., Murray, M. F., and Sharp, P. A. (2003). Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell* *5*, 351-358.
- Houchins, J. P., Yabe, T., McSherry, C., and Bach, F. H. (1991). DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* *173*, 1017-1020.
- Hu, M., Krause, D., Greaves, M., Sharkis, S., Dexter, M., Heyworth, C., and Enver, T. (1997). Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev* *11*, 774-785. 10.1101/gad.11.6.774.
- Hutvagner, G. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* *293*, 834-838.

- Ikuta, K., Kina, T., MacNeil, I., Uchida, N., Peault, B., Chien, Y. H., and Weissman, I. L. (1990). A developmental switch in thymic lymphocyte maturation potential occurs at the level of hematopoietic stem cells. *Cell* *62*, 863-874.
- Ito, Y., and Miyazono, K. (2003). RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling. *Curr Opin Genet Dev* *13*, 43-47.
- Jacobs R, H. G., Kemper A, Beul K, Kempf S, Behrens G, Sykora KW, Schmidt RE. (2001). CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *JEurJ Immunol* *10*, 3121-3127.
- Jacobs, R., Stoll, M., Stratmann, G., Leo, R., Link, H., and Schmidt, R. (1992). CD16- CD56+ natural killer cells after bone marrow transplantation. *Blood* *79*, 3239-3244.
- Johnson, C. D., Esquela-Kerscher, A., Stefani, G., Byrom, M., Kelnar, K., Ovcharenko, D., Wilson, M., Wang, X., Shelton, J., Shingara, J., *et al.* (2007). The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res* *67*, 7713-7722.
- Johnston, R. J., and Hobert, O. (2003). A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *426*, 845-849.
- Jordan, C. T., McKearn, J. P., and Lemischka, I. R. (1990). Cellular and developmental properties of fetal hematopoietic stem cells. *Cell* *61*, 953-963.
- Kahle P, W. P., Rehbein A, Kumbier I, Pawelec G. (1981). Cloning of functional human T lymphocytes by limiting dilution: impact of filler cells and interleukin 2 sources on cloning efficiencies. *Scand J Immunol* *14*, 493-502.
- Kantor, A. B., Stall, A. M., Adams, S., and Herzenberg, L. A. (1992). Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 3320-3324.
- Ketting, R. F. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* *15*, 2654-2659.
- Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* *115*, 209-216.
- Kieffer N, G. J., Farcet JP, Vainchenker W, Breton-Gorius J. (1987). Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *Eur J Biochem* *164*, 189-195.
- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., and Wigzell, H. (1975a). "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* *5*, 117-121.
- Kiessling, R., Klein, E., and Wigzell, H. (1975b). "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* *5*, 112-117.
- Kluiver, J., Kroesen, B. J., Poppema, S., and van den Berg, A. (2006). The role of microRNAs in normal hematopoiesis and hematopoietic malignancies. *Leukemia* *20*, 1931-1936.
- Kobari, L., Giarratana, M. C., Pflumio, F., Izac, B., Coulombel, L., and Douay, L. (2001). CD133+ cell selection is an alternative to CD34+ cell selection for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *J Hematother Stem Cell Res* *10*, 273-281.

- Kogler, G., Sensken, S., Airey, J. A., Trapp, T., Muschen, M., Feldhahn, N., Liedtke, S., Sorg, R. V., Fischer, J., Rosenbaum, C., *et al.* (2004). A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200, 123-135.
- Kondo, M., Weissman, I. L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.
- Kornbluth, J., Spear, B., Raab, S., and Wilson, D. (1985). Evidence for the role of class I and class II HLA antigens in the lytic function of a cloned line of human natural killer cells. *J Immunol* 134, 728-735.
- Krause, D. S., Fackler, M. J., Civin, C. I., and May, W. S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87, 1-13.
- Krek, A., Grun, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K. C., Stoffel, M., and Rajewsky, N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37, 495-500.
- Krichevsky, A. M., King, K. S., Donahue, C. P., Khrapko, K., and Kosik, K. S. (2003). A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *Rna* 9, 1274-1281.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853-858.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A., and Tuschl, T. (2003). New microRNAs from mouse and human. *Rna* 9, 175-179.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12, 735-739.
- Lai, E. C., Tomancak, P., Williams, R. W., and Rubin, G. M. (2003). Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome Biol* 4, R42.
- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A. O., Landthaler, M., *et al.* (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129, 1401-1414.
- Landthaler, M., Yalcin, A., and Tuschl, T. (2004). The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol* 14, 2162-2167.
- Lanier, L. L. (1998a). Follow the leader: NK cell receptors for classical and nonclassical MHC class I. *Cell* 92, 705-707.
- Lanier, L. L. (1998b). NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16, 359-393.
- Lao, K., Xu, N. L., Sun, Y. A., Livak, K. J., and Straus, N. A. (2007). Real time PCR profiling of 330 human micro-RNAs. *Biotechnol J* 2, 33-35.
- Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., and Bartel, D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858-862.
- Lee, R. C., and Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862-864.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.

- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* *425*, 415-419.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., Kim, S., and Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo J* *21*, 4663-4670.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., and Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* *23*, 4051-4060.
- Lewis, B. P., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* *120*, 15-20.
- Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., and Burge, C. B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* *115*, 787-798.
- Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engle, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., Bartel, D. P., Linsley, P. S., and Johnson, J. M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* *433*, 769-773.
- Lim, L. P., Lau, N. C., Weinstein, E. G., Abdelhakim, A., Yekta, S., Rhoades, M. W., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2003). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* *17*, 991-1008.
- Linsley, P. S., Schelter, J., Burchard, J., Kibukawa, M., Martin, M. M., Bartz, S. R., Johnson, J. M., Cummins, J. M., Raymond, C. K., Dai, H., *et al.* (2007). Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. *Mol Cell Biol* *27*, 2240-2252.
- Liu, J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* *305*, 1437-1441.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* *303*, 95-98.
- Ma, J. B., Yuan, Y. R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T., and Patel, D. J. (2005). Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* *434*, 666-670.
- Mallory, A. C., and Vaucheret, H. (2006). Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nat Genet* *38 Suppl*, S31-36.
- Mayani, H., Dragowska, W., and Lansdorp, P. M. (1993a). Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34+ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. *Blood* *82*, 2664-2672.
- Mayani, H., Dragowska, W., and Lansdorp, P. M. (1993b). Lineage commitment in human hemopoiesis involves asymmetric cell division of multipotent progenitors and does not appear to be influenced by cytokines. *J Cell Physiol* *157*, 579-586.
- Medvinsky, A., and Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* *86*, 897-906.
- Medvinsky, A. L., Samoylina, N. L., Muller, A. M., and Dzierzak, E. A. (1993). An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* *364*, 64-67.
- Megraw, M., Sethupathy, P., Corda, B., and Hatzigeorgiou, A. G. (2007). miRGen: a database for the study of animal microRNA genomic organization and function. *Nucleic Acids Res* *35*, D149-155.

- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* *15*, 185-197.
- Meister, G., and Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* *431*, 343-349.
- Metcalf, D. (1998). Pre-progenitor cells: a proposed new category of hematopoietic precursor cells. *Leukemia* *12*, 1-3.
- Michael, M. Z., SM, O. C., van Holst Pellekaan, N. G., Young, G. P., and James, R. J. (2003). Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* *1*, 882-891.
- Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Townsend, M., Yoshii, A., Sestan, N., Rakic, P., Constantine-Paton, M., and Horvitz, H. R. (2004). Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol* *5*, R68.
- Monticelli, S., Ansel, K. M., Xiao, C., Socci, N. D., Krichevsky, A. M., Thai, T. H., Rajewsky, N., Marks, D. S., Sander, C., Rajewsky, K., *et al.* (2005). MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol* *6*, R71.
- Moore, M. A., and Metcalf, D. (1970). Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* *18*, 279-296.
- Moretta, L., Biassoni, R., Bottino, C., Cantoni, C., Pende, D., Mingari, M. C., and Moretta, A. (2002a). Human NK cells and their receptors. *Microbes Infect* *4*, 1539-1544.
- Moretta, L., Bottino, C., Pende, D., Mingari, M. C., Biassoni, R., and Moretta, A. (2002b). Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol* *32*, 1205-1211.
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* *16*, 720-728.
- Muljo, S. A., Ansel, K. M., Kanellopoulou, C., Livingston, D. M., Rao, A., and Rajewsky, K. (2005). Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer. *J Exp Med* *202*, 261-269.
- Muller, A. M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F., and Dzierzak, E. (1994). Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* *1*, 291-301.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, and H., E. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *51*, 263-273.
- Nair, V., and Zavolan, M. (2006). Virus-encoded microRNAs: novel regulators of gene expression. *Trends Microbiol* *14*, 169-175.
- Nakauchi, H. (1998). Hematopoietic stem cells: are they CD34-positive or CD34-negative? *Nat Med* *4*, 1009-1010.
- Nelson, P. T., Baldwin, D. A., Scearce, L. M., Oberholtzer, J. C., Tobias, J. W., and Mourelatos, Z. (2004). Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs. *Nat Methods* *1*, 155-161.
- Newman PJ, G. J., White G C, 2nd, Gidwitz S, Cretney C J, and Aster R H (1988). Enzymatic amplification of platelet-specific messenger RNA using the polymerase chain reaction. *J Clin Invest* *82*, 739-743.

- Ottersbach, K., and Dzierzak, E. (2005). The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Dev Cell* 8, 377-387.
- Palatnik, J. F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J. C., and Weigel, D. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425, 257-263.
- Parker, J. S., and Barford, D. (2006). Argonaute: A scaffold for the function of short regulatory RNAs. *Trends Biochem Sci* 31, 622-630.
- Parker, J. S., Roe, S. M., and Barford, D. (2004). Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *Embo J* 23, 4727-4737.
- Parker, J. S., Roe, S. M., and Barford, D. (2005). Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* 434, 663-666.
- Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., Hayward, D. C., Ball, E. E., Degnan, B., Muller, P., *et al.* (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86-89.
- Peters, L., and Meister, G. (2007). Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell* 26, 611-623.
- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grasser, F. A., van Dyk, L. F., Ho, C. K., Shuman, S., Chien, M., *et al.* (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* 2, 269-276.
- Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., and Filipowicz, W. (2007). Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol* 17, 118-126.
- Raghavachari, N., Xu, X., Harris, A., Villagra, J., Logun, C., Barb, J., Solomon, M. A., Suffredini, A. F., Danner, R. L., Kato, G., *et al.* (2007). Amplified Expression Profiling of Platelet Transcriptome Reveals Changes in Arginine Metabolic Pathways in Patients With Sickle Cell Disease. [10.1161/CIRCULATIONAHA.106.658641](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.658641). *Circulation* 115, 1551-1562.
- Ramkissoon, S. H., Mainwaring, L. A., Ogasawara, Y., Keyvanfar, K., McCoy, J. P., Jr., Sloand, E. M., Kajigaya, S., and Young, N. S. (2006). Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. *Leuk Res* 30, 643-647.
- Razin, A. (1998). CpG methylation, chromatin structure and gene silencing—a three-way connection. *Embo J* 17, 4905-4908.
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.
- Rivas, F. V., Tolia, N. H., Song, J. J., Aragon, J. P., Liu, J., Hannon, G. J., and Joshua-Tor, L. (2005). Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol* 12, 340-349.
- Robb, L., and Elefanty, A. G. (1998). The hemangioblast—an elusive cell captured in culture. *Bioessays* 20, 611-614.
- Robertson MJ, C. K., Cameron C, Le JM, Tantravahi R, Ritz J. (1996). Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. *Exp Hematol* 24, 406-415.
- Rodgers, K. E., Xiong, S., Steer, R., and diZerega, G. S. (2000). Effect of Angiotensin II on Hematopoietic Progenitor Cell Proliferation. [10.1634/stemcells.18-4-287](https://doi.org/10.1634/stemcells.18-4-287). *Stem Cells* 18, 287-294.

- Rox, J. M., Bugert, P., Muller, J., Schorr, A., Hanfland, P., Madlener, K., Kluter, H., and Potzsch, B. (2004). Gene Expression Analysis in Platelets from a Single Donor: Evaluation of a PCR-Based Amplification Technique 10.1373/clinchem.2004.035386. *Clin Chem* 50, 2271-2278.
- Russell, E. S. (1979). Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv Genet* 20, 357-459.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, and N., A. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Scherer WF, S. J., Gey GO. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 97, 695-710.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.
- Sempere, L. F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., and Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* 5, R13.
- Sempere, L. F., Sokol, N. S., Dubrovsky, E. B., Berger, E. M., and Ambros, V. (2003). Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by hormonal signals and broad-Complex gene activity. *Dev Biol* 259, 9-18.
- Shalon, D., Smith, S. J., and Brown, P. O. (1996). A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. 10.1101/gr.6.7.639. *Genome Res* 6, 639-645.
- Slack, F. J., Basson, M., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H. R., and Ruvkun, G. (2000). The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the *LIN-29* transcription factor. *Mol Cell* 5, 659-669.
- Smalheiser, N. R. (2003). EST analyses predict the existence of a population of chimeric microRNA precursor-mRNA transcripts expressed in normal human and mouse tissues. *Genome Biol* 4, 403.
- Song, J.-J., Liu, J., Tolia, N. H., Schneiderman, J., Smith, S. K., Martienssen, R. A., Hannon, G. J., and Joshua-Tor, L. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *10*, 1026-1032.
- Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J., and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305, 1434-1437.
- Song, L., and Tuan, R. S. (2006). MicroRNAs and cell differentiation in mammalian development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 78, 140-149.
- Sontheimer, E. J., and Carthew, R. W. (2005). Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell* 122, 9-12.
- Steidl, U., Bork, S., Schaub, S., Selbach, O., Seres, J., Aivado, M., Schroeder, T., Rohr, U.-P., Fenk, R., Kliszewski, S., *et al.* (2004). Primary human CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells express functionally active receptors of neuromediators 10.1182/blood-2004-01-0373. *Blood* 104, 81-88.

- Strauss, W. M., Chen, C., Lee, C. T., and Ridzon, D. (2006). Nonrestrictive developmental regulation of microRNA gene expression. *Mamm Genome* 17, 833-840.
- Suh, M. R., Lee, Y., Kim, J. Y., Kim, S. K., Moon, S. H., Lee, J. Y., Cha, K. Y., Chung, H. M., Yoon, H. S., Moon, S. Y., *et al.* (2004). Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol* 270, 488-498.
- Tang, F., Hajkova, P., Barton, S. C., Lao, K., and Surani, M. A. (2006a). MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 34, e9.
- Tang, F., Hajkova, P., Barton, S. C., O'Carroll, D., Lee, C., Lao, K., and Surani, M. A. (2006b). 220-plex microRNA expression profile of a single cell. *Nat Protoc* 1, 1154-1159.
- Tang, F., Kaneda, M., O'Carroll, D., Hajkova, P., Barton, S. C., Sun, Y. A., Lee, C., Tarakhovsky, A., Lao, K., and Surani, M. A. (2007). Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev* 21, 644-648.
- Temin HM, M. S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226, 1211-1213.
- Terskikh, A. V., Miyamoto, T., Chang, C., Diatchenko, L., and Weissman, I. L. (2003). Gene expression analysis of purified hematopoietic stem cells and committed progenitors 10.1182/blood-2002-08-2509. *Blood* 102, 94-101.
- Timonen, T., Ortaldo, J. R., and Herberman, R. B. (1981). Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *J Exp Med* 153, 569-582.
- Trevisan, M., and Iscove, N. N. (1995). Phenotypic analysis of murine long-term hemopoietic reconstituting cells quantitated competitively in vivo and comparison with more advanced colony-forming progeny. *J Exp Med* 181, 93-103.
- Trompeter, H. I., Gomez-Lozano, N., Santourlidis, S., Eisermann, B., Wernet, P., Vilches, C., and Uhrberg, M. (2005). Three structurally and functionally divergent kinds of promoters regulate expression of clonally distributed killer cell Ig-like receptors (KIR), of KIR2DL4, and of KIR3DL3. *J Immunol* 174, 4135-4143.
- Unwin, R. D., and Whetton, A. D. (2006). Systematic proteome and transcriptome analysis of stem cell populations. *Cell Cycle* 5, 1587-1591.
- Waddington, c. H. (1957). *The strategy of the genes*. London: Allen & Unwin.
- Weber, M. J. (2005). New human and mouse microRNA genes found by homology search. *Febs J* 272, 59-73.
- Weissman, I. L. (2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287, 1442-1446.
- Wendt K, W. E., Buyny S, Buer J, Schmidt RE, Jacobs R. (2006). Gene and protein characteristics reflect functional diversity of CD56dim and CD56bright NK cells. *J Leukoc Biol* 80, 1529-1541.
- Wernet, P. (2006). Increasing impact of microRNAs in stem cell biology and medicine. *Stem Cell Transplantation, Biology, Processing and Therapy*, 43-52.
- Weyrich AS, Z. G. (2004). Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol* 25, 489-495.

- Wienholds, E., Kloosterman, W. P., Miska, E., Alvarez-Saavedra, E., Berezikov, E., de Bruijn, E., Horvitz, H. R., Kauppinen, S., and Plasterk, R. H. (2005). MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* *309*, 310-311.
- Wightman, B., Burglin, T. R., Gatto, J., Arasu, P., and Ruvkun, G. (1991). Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes Dev* *5*, 1813-1824.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* *75*, 855-862.
- Williamson, A. J., Smith, D. L., Blinco, D., Unwin, R. D., Pearson, S., Wilson, C., Miller, C., Lancashire, L., Lacaud, G., Kouskoff, V., and Whetton, A. D. (2007). Quantitative proteomic analysis demonstrates post-transcriptional regulation of embryonic stem cell differentiation to hematopoiesis. *Mol Cell Proteomics*.
- Wu H, N. J., Kumar P, Manocha M, Shankar P, Sharp PA, Manjunath N. (2007). miRNA Profiling of Naïve, Effector and Memory CD8 T Cells. *PLoS ONE* *2*, e1020.
- Xu, P., Vernooy, S. Y., Guo, M., and Hay, B. A. (2003). The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol* *13*, 790-795.
- Yang, B., Lin, H., Xiao, J., Lu, Y., Luo, X., Li, B., Zhang, Y., Xu, C., Bai, Y., Wang, H., *et al.* (2007). The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med* *13*, 486-491.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., and Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* *17*, 3011-3016.
- Yuan, Y. R., Pei, Y., Ma, J. B., Kuryavyi, V., Zhadina, M., Meister, G., Chen, H. Y., Dauter, Z., Tuschl, T., and Patel, D. J. (2005). Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol Cell* *19*, 405-419.
- Zamore, P. D., and Haley, B. (2005). Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science* *309*, 1519-1524.
- Zeng, Y., and Cullen, B. R. (2003). Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *Rna* *9*, 112-123.
- Zhang, H., Kolb, F. A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., and Filipowicz, W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* *118*, 57-68.
- Zhao, J. J., Sun, D. G., Wang, J., Liu, S. R., Zhang, C. Y., Zhu, M. X., and Ma, X. (2007). Retinoic acid downregulates microRNAs to induce abnormal development of spinal cord in spina bifida rat model. *Childs Nerv Syst*.
- Zhou, B., Wang, S., Mayr, C., Bartel, D. P., and Lodish, H. F. (2007). miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. [10.1073/pnas.0702409104](https://doi.org/10.1073/pnas.0702409104). *Proceedings of the National Academy of Sciences* *104*, 7080-7085.

Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen, die diese Arbeit begleitet und ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt:

PD Dr. Markus Uhrberg möchte ich für die Überlassung des Themas, das Heranführen an die NK-Zellen, seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und das in mich gesetzte Vertrauen danken.

Prof. Dr. Peter Wernet danke ich, dass ich diese umfangreiche Dissertation an seinem Institut anfertigen durfte und dass auch er nie den Glauben an mich verloren hat.

Prof. Dr. C. Hollenberg danke ich für die Übernahme des Korreferats an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Prof. Dr. J. Ernst möchte ich danken, dass er die Mitbetreuung übernommen hat.

Ein ganz großes Danke möchte ich Kai Lao und Simone Günther von ABI sagen, ohne deren Kooperationsbereitschaft ich die Welt der miRNAs nicht hätte so erforschen können.

Ganz herzlich danke ich allen heutigen, ehemaligen und `adoptierten` Mitgliedern der Arbeitsgruppe Uhrberg; jeder von Euch hat mich in den vergangenen Jahren unterstützt und diese Zeit zu etwas besonderem gemacht.

Außerdem danke ich Dr. J. Fischer für die vielen Stunden, die er mich in das Prozedere des Sortens eingearbeitet hat.

Frau Prof. Dr. G. Kögler danke ich für die Bereitstellung der Nabelschnurblute.

Der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. O. Brüstle danke ich für die Bereitstellung der embryonalen Stammzellen und so manchen Ansporn.

Der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Bojar danke ich für die bereitwillige Überlassung des TaqMans zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Zusätzlich möchte ich allen Mitarbeitern des ITZ danken.

Mein allergrößter Dank gilt meiner Mutter. Danke, dass Du mir alles ermöglicht hast!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Ich erkläre gleichzeitig, dass ich die vorgelegte Dissertation in dieser oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht habe. Weiterhin erkläre ich hiermit, dass ich vorher noch keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen habe.

Sandra Weinhold

Düsseldorf, Dezember 2007